

***Neurospora crassa* als Produktionswirt für heterologe Proteine:
Entwicklung eines Expressionssystems und Optimierung des
Produktionsprozesses**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von David Havlik
aus Prag / Tschechische Republik

| | |
|-------------------------------------|---------------------------------|
| 1. Referent: | Professor Dr. André Fleißner |
| 2. Referent: | apl. Professor Dr. Udo Rau |
| 3. Referent: | apl. Professor Dr. Michael Hust |
| eingereicht am: | 31.08.2015 |
| mündliche Prüfung (Disputation) am: | 10.12.2015 |
| Druckjahr | 2016 |

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Havlik, D., Bohle, K. & Fleißner, A.: Engineering of *Neurospora crassa* for the production of heterologous proteins (Vortrag). *Neurospora crassa* Satellite Meeting, Sevilla, Spanien, 2014

Havlik, D., Bohle, K. & Fleißner, A.: Engineering of *Neurospora crassa* for the production of heterologous proteins (Poster). 12th *European Conference of Fungal Genetics*, Sevilla, Spanien, 2014

Havlik, D., Vernen, F., Bohle, K., Hust, M., Dübel, S. & Fleißner, A.: Development of a fungal expression system for the production of antibody fragments (Poster). Annual Conference of the German Genetics Society, Braunschweig, 2013

Havlik, D., Vernen, F., Bohle, K., Hust, M., Dübel, S. & Fleißner, A.: Development of a fungal expression system for the production of antibody fragments (Poster). Protein and Antibody Engineering Summit, Wien, Österreich, 2012

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| ZUSAMMENFASSUNG | IX |
| ABSTRACT | X |
| 1 EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 Expressionssysteme für pharmazeutische Proteine | 1 |
| 1.2 Filamentöse Pilze als Produktionsorganismen für rekombinante Proteine | 3 |
| 1.3 Aufbau von pilzlichen Expressionssystemen | 3 |
| 1.4 Wachstum von filamentösen Pilzen | 5 |
| 1.4.1 Wachstum von Hyphen | 5 |
| 1.4.2 Wachstum in submerser Kultur | 6 |
| 1.4.3 Proteinsekretion in filamentösen Pilzen | 8 |
| 1.5 Optimierung der Proteinproduktion bei filamentösen Pilzen | 11 |
| 1.5.1 Gentechnische Maßnahmen | 11 |
| 1.5.2 Prozesstechnische Maßnahmen | 13 |
| 1.6 <i>Neurospora crassa</i> | 15 |
| 1.6.1 Lebenszyklus | 15 |
| 1.6.2 Heterologe Proteinexpression in <i>N. crassa</i> | 17 |
| 1.7 Antikörper | 18 |
| 1.7.1 Aufbau und Funktion | 18 |
| 1.7.2 Rekombinante Antikörper | 20 |
| 1.7.3 Anwendung von Antikörpern und rekombinanten Antikörperfragmenten | 21 |
| 1.7.4 Expressionssysteme für rekombinante Antikörper | 22 |
| 1.8 Zielsetzung | 24 |
| 2 MATERIAL UND METHODEN | 26 |
| 2.1 Mikroorganismen: Stämme und Medien | 26 |
| 2.1.1 <i>Neurospora crassa</i> | 26 |
| 2.1.2 <i>Escherichia coli</i> | 30 |
| 2.1.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 31 |
| 2.2 Chemikalien und Reagenzien | 31 |
| 2.3 Puffer und Lösungen | 32 |
| 2.4 Enzyme | 35 |
| 2.5 Antikörper | 35 |
| 2.6 Plasmide | 36 |
| 2.7 Primer | 36 |
| 2.8 Verbrauchsmaterial | 38 |
| 2.9 Geräte und technische Anlagen | 39 |
| 2.10 Software und Datenbanken | 40 |
| 2.11 Molekularbiologische Methoden | 40 |
| 2.11.1 DNA-Isolierung | 40 |
| 2.11.1.1 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> | 40 |
| 2.11.1.2 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i> | 41 |
| 2.11.1.3 Isolation genomischer DNA aus <i>N. crassa</i> | 41 |
| 2.11.2 DNA-Amplifizierung mittels Polymerase-Kettenreaktion | 42 |
| 2.11.3 Restriktionsverdau von DNA | 43 |
| 2.11.4 Agarose-Gelelektrophorese | 43 |
| 2.11.5 Ligation | 43 |
| 2.11.6 DNA-Konzentrationsbestimmung | 44 |
| 2.11.7 DNA-Sequenzierung | 44 |
| 2.11.8 Codon-Optimierung | 44 |
| 2.11.9 <i>Yeast Recombinational Cloning</i> | 44 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 2.12 | Mikrobiologische Methoden | 46 |
| 2.12.1 | Transformation | 46 |
| 2.12.1.1 | <i>Escherichia coli</i> | 46 |
| 2.12.1.2 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 46 |
| 2.12.1.3 | <i>Neurospora crassa</i> | 47 |
| 2.12.2 | Kreuzung von <i>N. crassa</i> | 48 |
| 2.12.3 | Genotypisierung von <i>N. crassa</i> | 49 |
| 2.12.3.1 | <i>his-3</i> | 49 |
| 2.12.3.2 | <i>exo-1</i> | 49 |
| 2.12.3.3 | <i>exo-1</i> , <i>Δvib-1</i> und <i>Δgla-1</i> | 50 |
| 2.12.3.4 | Deletionsmutanten mit <i>bar</i> -Kassette | 50 |
| 2.12.3.5 | Deletionsmutanten mit <i>hph</i> -Kassette | 50 |
| 2.12.3.6 | <i>Mating type</i> -Assay | 50 |
| 2.12.3.7 | PCR-Verfahren | 51 |
| 2.12.4 | Erzeugung und Überprüfung von <i>N. crassa</i> -Transformanten | 52 |
| 2.12.4.1 | Integration der Expressionskassette am <i>gla-1</i> -Locus | 52 |
| 2.12.4.2 | Integration der Expressionskassette am <i>his-3</i> -Locus | 52 |
| 2.12.5 | Dauerkulturen | 53 |
| 2.12.5.1 | <i>Escherichia coli</i> | 53 |
| 2.12.5.2 | <i>Neurospora crassa</i> | 53 |
| 2.13 | Kultivierungsmethoden | 54 |
| 2.13.1 | Produktion von scFv mit <i>E. coli</i> | 54 |
| 2.13.2 | Kultivierung von <i>Neurospora crassa</i> | 55 |
| 2.13.2.1 | Wachstum auf Schrägagarrröhrchen | 55 |
| 2.13.2.2 | Herstellen von Sporensuspensionen für Schüttelkolbenkultivierungen | 55 |
| 2.13.2.3 | Kultivierung in Schüttelkolben | 56 |
| 2.13.2.4 | Kultivierung auf Festmedium mit Übersichtung mit Flüssigmedium | 56 |
| 2.13.2.5 | Kultivierung in einem parallelen Bioreaktorsystem (DASGIP-System) | 57 |
| 2.13.2.6 | Kultivierung in 10 L-Edelstahlreaktoren | 59 |
| 2.13.3 | Berechnungen | 61 |
| 2.13.3.1 | Bestimmung der Biotrockenmasse | 61 |
| 2.13.3.2 | Berechnung der spezifischen Wachstumsrate μ | 62 |
| 2.13.3.3 | Ertragskoeffizient $Y_{X/S}$ | 62 |
| 2.13.3.4 | Abgasanalyse | 62 |
| 2.13.3.5 | Kennzahlen für die Aufstellung eines Substrat limitierten Fed-Batch-Verfahrens | 63 |
| 2.14 | Biochemische Methoden | 64 |
| 2.14.1 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 64 |
| 2.14.2 | Western Blot | 65 |
| 2.14.3 | Immunostain | 66 |
| 2.14.3.1 | NBT/BCIP-Methode | 66 |
| 2.14.3.2 | ECL-Methode | 66 |
| 2.14.4 | Proteinfällung | 67 |
| 2.14.5 | Dialyse | 67 |
| 2.14.6 | Bestimmung von Glucose in Kulturüberständen | 68 |
| 2.14.7 | Bestimmung von Maltose (Aldosen) in Kulturüberständen | 68 |
| 2.14.8 | α -Amylase-Aktivitätsassay | 69 |
| 2.14.9 | Bestimmung von Ammoniak in Kulturüberständen | 70 |
| 2.14.10 | Proteinbestimmung mittels Bradford-Assay | 70 |
| 2.14.11 | Proteinextraktion von biomasseassoziierten Proteinen | 71 |
| 2.14.12 | Protease-Assay | 71 |
| 2.14.12.1 | Gelmethode | 71 |
| 2.14.12.2 | Azocasein-Methode | 72 |
| 2.14.13 | <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA) | 72 |
| 2.14.14 | Metallchelat-Affinitätschromatographie (IMAC) | 73 |
| 2.14.14.1 | Proteinaufreinigung mit losen Säulenmaterial | 74 |
| 2.14.14.2 | Proteinaufreinigung mit gepacktem Säulenmaterial und HPLC | 75 |
| 3 | ERGEBNISSE | 76 |
| 3.1 | Identifizierung von essentiellen Elementen des Expressionssystems | 76 |
| 3.1.1 | Wachstumsverhalten des Wildtyps und Identifizierung des Carrierproteins | 76 |
| 3.1.2 | Identifizierung eines proteasedefizienten Stammes | 80 |
| 3.1.3 | Hypersekretion der Glucoamylase durch <i>exo-1</i> -Mutation | 82 |

| | | |
|------------|--|-------------------|
| 3.2 | Produktion von Antikörperfusionsproteinen basierend auf der vollständigen Glucoamylase als Carrier | 83 |
| 3.2.1 | Aufbau des Expressionssystems | 83 |
| 3.2.2 | Expression von GLA-1-HT186-D11 am nativen Locus mit <i>Avib-1</i> -Hintergrund | 85 |
| 3.2.3 | Kultivierung bei verminderter Temperatur | 87 |
| 3.2.4 | Anpassung des Expressionssystems | 91 |
| 3.3 | Produktion von Antikörperfusionsproteinen basierend auf einer gekürzten Form der Glucoamylase als Carrier | 92 |
| 3.3.1 | Einführung eines neuen modularen Expressionssystems mit abgewandeltem <i>Carrier</i> -Protein | 92 |
| 3.3.2 | Expression von GLA ₁ -HT186-D11 mit drei verschiedenen Promotoren | 94 |
| 3.3.3 | Expression von GLA ₁ -HT186 in Stämmen mit <i>Avib-1</i> und <i>exo-1</i> | 97 |
| 3.4 | Prozessoptimierung in einem parallelen Bioreaktorsystem | 106 |
| 3.4.1 | Allgemeines | 106 |
| 3.4.2 | Vergleich von Glucose und Maltose als Kohlenstoffquelle | 108 |
| 3.4.3 | Einflusses des Stickstoffgehaltes im Medium auf die Proteaseaktivität | 112 |
| 3.4.4 | Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes auf die Proteaseaktivität | 117 |
| 3.4.4.1 | Kultivierung ohne pH-Wert-Regulierung sowie pH-Werte 4,5 – 5,7 | 117 |
| 3.4.4.2 | Kultivierung bei pH-Wert zwischen pH 6,5 und 7,5 | 120 |
| 3.4.5 | Einfluss des Promotors im optimierten Prozess | 123 |
| 3.4.6 | Fazit der Optimierung des Prozesses | 126 |
| 3.5 | Proteasedefizienz durch Deletionen von einzelnen Proteasegenen | 127 |
| 3.5.1 | Auswahl an zu überprüfenden Proteasegenen | 127 |
| 3.5.2 | Überprüfung von Proteasedelektionsmutanten auf verringerte Proteaseaktivität | 129 |
| 3.5.3 | Vergleich von Produktionsstämmen mit <i>Avib-1</i> und Stämmen mit Deletionen von vier Proteasegenen | 132 |
| 3.5.4 | Isolation des Fusionsproteins aus dem Kulturüberstand für beide Ansätze der Proteasedefizienz | 138 |
| 3.6 | Scale-Up auf 10 L-Maßstab | 141 |
| 3.6.1 | Vergleich von Wachstum in 1 L- und 10 L-Maßstab | 141 |
| 3.6.2 | Produktion bei Batch- und Fed-Batch-Verfahren | 144 |
| 3.6.3 | Abschätzung der Menge an produziertem heterologen Fusionsprotein | 153 |
| 4 | <u>DISKUSSION</u> | <u>156</u> |
| 4.1 | Abbau heterologer Proteine durch Proteasen | 156 |
| 4.2 | Aufbau des Expressionssystems | 163 |
| 4.2.1 | Sekretion des Fusionsproteins in den Kulturüberstand | 163 |
| 4.2.2 | Promotoren | 168 |
| 4.2.3 | <i>Codon Usage</i> | 171 |
| 4.3 | Wachstumsverhalten von <i>N. crassa</i> und Prozessoptimierung | 173 |
| 4.4 | <i>N. crassa</i> als Produktionssystem für heterologe Proteine | 181 |
| 4.5 | Ausblick | 184 |
| 5 | <u>LITERATURVERZEICHNIS</u> | <u>188</u> |
| 6 | <u>ANHANG</u> | <u>199</u> |
| 6.1 | Ergänzende Ergebnisse | 199 |
| 6.2 | Plasmidkarten | 202 |
| 6.3 | Bestätigung von erzeugten Stämmen | 209 |
| 6.3.1 | Transformierbare Stämme | 209 |
| 6.3.2 | Produktionsstämme | 211 |
| 6.3.3 | Sonstige Stämme | 218 |
| 6.4 | Erzeugung von <i>Pccg1nr</i> mittels rekombinanter Hefeklonierung | 219 |
| | <u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u> | <u>220</u> |
| | <u>DANKSAGUNG</u> | <u>222</u> |

Zusammenfassung

Filamentöse Pilze besitzen die Eigenschaft, Proteinmengen im g/L-Maßstab in ihre Umgebung zu sekretieren. Aufgrund ihrer einfachen Handhabung stellen sie daher interessante Organismen für die biotechnologische Produktion von Proteinen dar. In dieser Arbeit wurde der rote Brotschimmel *Neurospora crassa* als Produktionswirt für heterologe Proteine verwendet. Hierbei handelt es sich um einen seit Jahrzehnten etablierten Modellorganismus, weswegen viele molekulare Werkzeuge für seine gentechnische Manipulation zur Verfügung stehen und somit die Proteinproduktion auf einfache Art und Weise erreicht werden kann. Als Modellproteine wurden die Antikörperfragmente HT186-D11 und D1.3 verwendet. Ziel dieser Arbeit war die Sekretion des Produktes in Form eines Fusionsproteins mit einem pilzeigenen Protein, hier der Glucoamylase, welches als *Carrier* fungiert.

Diese Arbeit war in zwei Phasen unterteilt. In der ersten Phase wurden Produktionsstämme generiert und anhand von Kultivierungen im Schüttelkolbenmaßstab bewertet. Als *Carrier*-Protein wurde sowohl die vollständige Glucoamylase als auch eine gekürzte Form verwendet. Es wurden verschiedene Promotoren, genetische Hintergründe und eine unterschiedliche *Codon usage* des Antikörperfragment-Gens miteinander verglichen. Der kritische Schritt bei der Stammerzeugung war die Beseitigung extrazellulärer Proteaseaktivität. Dazu wurden zwei Strategien verglichen: die Deletion eines Transkriptionsfaktorgens und die Deletion von mehreren Proteasegenen, welche zuvor identifiziert wurden.

In der zweiten Phase wurde schrittweise ein Scale-Up auf ein Arbeitsvolumen von 9 L durchgeführt. Dabei wurde das Wachstum charakterisiert und der Prozess optimiert. Hierfür wurde zunächst ein paralleles Bioreaktorsystem (1 L) verwendet. Es wurde festgestellt, dass das verwendete Minimalmedium eine zu geringe Konzentration der Stickstoffquelle enthält. Nach der Medienoptimierung wurde gezeigt, dass der pH-Wert die verbliebene Proteaseaktivität im Kulturüberstand beeinflusst und pH 6,5 als optimaler pH-Wert für die geringste Aktivität identifiziert. Durch die Verwendung von Komplexmedium anstatt von Minimalmedium konnten sowohl die Ausbeute (15 mg/L) als auch die Wachstumsgeschwindigkeit erhöht werden. Die Ausschaltung mehrerer Proteasegene führte zu höheren Produktmengen als die Deletion des Transkriptionsfaktorgens und in beiden Medien zur vollständigen Unterdrückung der Proteaseaktivität während der Batch-Phase. Das produzierte Protein wurde mittels Affinitätschromatographie isoliert, zeigte jedoch nur eine geringe Aktivität auf. Abschließend wurde nach einem Scale-Up auf 9 L ein Batch-Verfahren mit einem Fed-Batch-Verfahren verglichen.

Abstract

Filamentous fungi have the capacity to secrete large amounts of proteins (order of g/L) into their environment. Due to their simple handling they are attractive organisms for the biotechnological production of proteins. In this thesis, the red bread mold *Neurospora crassa* was engineered for the production of heterologous proteins. This organism has been used as a model organism for decades which is why many tools are available for its genetic manipulation. It therefore provides a suitable system for protein production. The antibody fragments HT186-D11 and D1.3 were used as model proteins. The aim of the project was to achieve secretion of the protein of interest fused to an endogenous fungal carrier protein, which in this case was the glucoamylase.

The project was divided in two phases. In the first phase, production strains were generated and the production evaluated in shaking flask scale. Both the full enzyme and a truncated version of the glucoamylase were used as carrier proteins. Different promoters, genetic backgrounds and two types of codon usage were compared. The crucial step in the generation of the production strains was the elimination of the extracellular protease activity in the culture supernatant. For this purpose, two strategies were compared: the deletion of a transcription factor gene and the deletion of several protease genes, which were identified beforehand.

In the second phase, an incremental scale-up was performed up to a working volume of 9 L, the growth of the fungus was characterized, and the process was optimized. For the optimization, a parallel bioreactor system (1 L) was used initially. Thereby, an insufficient concentration of the nitrogen source was determined in the used minimal medium. After optimization of the medium it was shown that the remaining protease activity in the culture supernatant is influenced by the pH value of the medium, with the lowest activity at pH 6.5. By cultivating in complex medium instead of minimal medium, both the yield (15 mg/L) and the growth rate were increased. Compared to the deletion of a transcription factor gene, the deletion of multiple protease genes led to higher product yields and the complete elimination of protease activity in both media during the batch phase. The produced protein was isolated via affinity chromatography although only a small amount showed activity. Finally, a batch and a fed-batch process were compared after a scale-up to 9 L.

1 Einleitung

1.1 Expressionssysteme für pharmazeutische Proteine

Mit einem jährlichen Umsatz von 163 Mrd. US Dollar besitzen biopharmazeutische Produkte, zu denen therapeutische Proteine und Nukleinsäuren gezählt werden, mittlerweile einen Marktanteil von 20 % des pharmazeutischen Marktes (Otto *et al.*, 2014). In den USA und der Europäischen Union wurden bis zum Jahr 2015 ca. 280 Biopharmazeutika von den Zulassungsbehörden FDA (*Food and Drug Administration*) bzw. EMA (*European Medicines Agency*) zugelassen (Berlec & Štrukelj, 2013; BIOPHARMA, 2015). Aufgrund der hohen Bandbreite der potentiellen Produkte ist eine hohe Nachfrage nach verschiedenen Produktionssystemen vorhanden. Von den 2013 zugelassenen Produkten wurden hierbei 40 % in Säugerzellen wie CHO (*chinese hamster ovary cells*), 30 % in Hefen wie *Pichia pastoris* oder *Saccharomyces cerevisiae*, 20 % im Bakterium *Escherichia coli* und 10 % in Insektenzellsystemen produziert (Walsh, 2014a). Bei den zugelassenen Produkten handelte es sich zum Beispiel um monoklonale Antikörper, Hormone oder Enzyme. Einige wenige zugelassene Produkte wurden in transgenen Tieren wie Ziege und Kaninchen (Walsh, 2012) oder in Pflanzen produziert (Walsh, 2014b). Filamentöse Pilze wurden in diesem Feld bislang noch nicht verwendet (BIOPHARMA, 2015; Walsh, 2006, 2010, 2014b).

Die Wahl des geeigneten Produktionssystems basiert auf der Komplexität des rekombinanten Proteins. So werden größere Proteine generell in eukaryotischen und kleinere Proteine eher in prokaryotischen Systemen produziert (Demain & Vaishnav, 2009). Einer der ersten Produktionsorganismen war das Enterobakterium *Escherichia coli*. Die Vorteile dieses Systems sind unter anderem schnelles Wachstum, hohe Ausbeuten und kostengünstige Kultivierung (Berlec & Štrukelj, 2013). Die größte Limitierung dieses Systems ist die fehlende Fähigkeit, posttranslationale Modifikationen durchzuführen. *E. coli* besitzt keinen Glykosylierungsapparat und Disulfidbindungen können lediglich im Periplasma gebildet werden. Im Cytoplasma synthetisierte Proteine akkumulieren meist zu unlöslichen Aggregaten, sogenannten *Inclusion Bodies* (Fischer *et al.*, 1993). Eine Rückführung der Proteine in ihre lösliche Form ist aufwändig, wird jedoch häufig durchgeführt, da *Inclusion Bodies* bereits in hoher Reinheit isoliert werden können, wodurch sich die vermeintlich aufwändige Rückfaltung wieder rechnet. Das Produktionssystem *E. coli* wird daher hauptsächlich für unglykosylierte Proteine geringer Größe eingesetzt. Ein weiterer Nachteil bei der Isolierung der Produkte bei *E. coli* war bislang der notwendige Zellaufschluss, da die Proteine entweder im Cyto- oder im Periplasma vorlagen. In den letzten Jahren wurden auch Systeme entwickelt, bei welchen das

Produkt zum Beispiel in Form eines Fusionsproteins direkt in das Kulturmedium sekretiert wird, wodurch eine Isolierung wesentlich vereinfacht wird (Gao *et al.*, 2015).

Ist eine Produktion in *E. coli* nicht möglich, so werden häufig Hefen für die Herstellung eingesetzt. Zu den am häufigsten verwendeten Hefen zählen *Saccharomyces cerevisiae* und *Pichia pastoris*. Da es sich hierbei um eukaryotische Organismen handelt, sind diese Zellen in der Lage, posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierung durchzuführen (Demain & Vaishnav, 2009). Sie sind ebenfalls geeignet für die Produktion disulfidbrückenreicher Proteine und können komplexe Proteine korrekt falten. Gleichzeitig ist die Handhabung der Zellen bei einer Kultivierung ähnlich einfach wie bei Bakterien, wodurch eine Kultivierung kostengünstig ist und hohe Ausbeuten erzielt werden können. Ein weiterer Vorteil ist die etablierte Sekretion von Proteinen in das Kulturmedium. Ein schwerwiegender Nachteil ist das Glykosylierungsmuster produzierter Proteine, welches eine andere Zusammensetzung besitzt als bei Säugetierproteinen, da die Zuckerketten nur Mannose enthalten. Häufig kommt es zu einer Hyperglykosylierung, die z. B. bei *S. cerevisiae* häufig auftritt (Deshpande *et al.*, 2008). Diese abweichende Glykosylierung kann zu immunologischen Reaktionen im Körper führen. Durch gentechnische Manipulation der Produktionsorganismen ist es jedoch bereits gelungen, den humanen Glykosylierungsapparat in *P. pastoris* nachzubilden und somit ein Produkt mit humanen Glykosylierungsmuster zu generieren (Choi *et al.*, 2003).

Ein wesentlich seltener genutztes Produktionssystem sind Insektenzellen. Hierbei werden meist Zellen des Eulenfalters *Spodoptera frugiperda* (z. B. Sf-9-Zellen) mit Baculoviren infiziert, welche als Vektorsystem dienen. Die Zellen werden anschließend in einer Suspension kultiviert. Die Vorteile dieses Systems liegen in einer ausgeprägten Faltungsmaschinerie sowie der Fähigkeit von posttranslationalen Modifikationen und der Synthese größerer Proteine. Je nach Produkt kommt es jedoch manchmal zu inkorrekturer Glykosylierung und geringen Ausbeuten (Demain & Vaishnav, 2009).

Das wichtigste Produktionssystem in der pharmazeutischen Biotechnologie stellen derzeit Säugetierzellen wie CHO-Zellen dar (Zhu, 2012). Sie werden eingesetzt, wenn korrekt gefaltete Proteine mit einer Säugetierglykosylierung benötigt werden. CHO-Zellen sekretieren die Proteine direkt in das Kulturmedium, wodurch aufwändige Zellaufschlussverfahren entfallen. Ein großer Nachteil dieses Systems waren lange und kostenintensive Kultivierungen und verhältnismäßig geringe Ausbeuten. Letzteres Problem wurde in den vergangenen Jahren jedoch gelöst, wodurch dieses Produktionssystem auch wirtschaftlich erfolgreich wurde (Zhang *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu pilzlichen Systemen ist die Zelllinienentwicklung

langwierig (bis zu 12 Monaten) und DNA kann zur Zeit nicht an definierten Genorten integriert werden, wodurch reproduzierbare Zelllinien nicht generiert werden können (Lai *et al.*, 2013).

1.2 Filamentöse Pilze als Produktionsorganismen für rekombinante Proteine

Filamentöse Pilze sind etablierte Produzenten von industriellen Enzymen, welche zum Beispiel in der Lebensmittel- oder Waschmittelindustrie verwendet werden (Archer & Peberdy, 1997). Zu den wichtigsten Produktionsorganismen zählen hierbei *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* und *Trichoderma reesei* (Nevalainen *et al.*, 2005). Aufgrund der hohen Sekretionskapazität produzieren industrielle Stämme von *A. niger* bis zu 20 g/L an α -Glucoamylase (van Brunt, 1986), und *T. reesei* produziert Cellulasen mit einer Gesamtkonzentration von bis zu 100 g/L (Cherry & Fidantsef, 2003). Der wichtigste Vorteil von filamentösen Pilzen als Expressionssystem für Proteine ist die Fähigkeit, posttranslationale Modifikationen wie proteolytische Spaltung, Knüpfung von Disulfidbrücken oder Glykosylierung durchzuführen. Zusätzlich können sie in kostengünstigen Medien kultiviert werden und sekretieren die Produkte direkt ins Medium. Insbesondere der letztgenannte Punkt stellt einen großen Vorteil gegenüber z. B. *E. coli* dar, da aufwändige und vor allem kostenintensive Zellaufschlussschritte entfallen (Su *et al.*, 2012).

Aus diesen Gründen wurden zahlreiche Spezies filamentöser Pilze für die Produktion heterologer Proteine eingesetzt. Unter anderem wurden so bovines Prochymosin (van den Brink *et al.*, 2006; Dunn-Coleman *et al.*, 1991; Ward *et al.*, 1990), humanes Interleukin-6 (Broekhuijsen *et al.*, 1993) und Lysozym (Jeenes *et al.*, 1993) produziert. Die erreichten Konzentrationen bewegten sich zwischen 15 mg/L für humanes Interleukin-6, 1 g/L für Lysozym und 1,4 g/L bovines Prochymosin (Dunn-Coleman *et al.*, 1991). Bei *T. reesei* wird als *Carrier*-Protein meist die Cellulase CBHI verwendet (Keränen & Penttilä, 1995).

1.3 Aufbau von pilzlichen Expressionssystemen

Die Expression von heterologen Proteinen in Pilzen basiert auf der stabilen Integration der Expressionskassette (Abb. 1.1) in das Genom. Dabei gibt es die Möglichkeit, die Expressionskassette homolog an einen vorher festgelegten Locus (Aramayo & Metzenberg, 1996; Ninomiya *et al.*, 2004) oder die DNA heterolog an zufällige Loci zu integrieren (Fleissner & Dersch, 2010). Beide Systeme bieten Vor- und Nachteile. So bietet die Integration

an einen definierten Locus eine bessere Reproduzierbarkeit der Transformanten und die Möglichkeit des Vergleiches verschiedener Loci. Die zufällige Integration an meist mehreren Loci bietet die Möglichkeit höhere Ausbeuten zu erlangen, wenn zufällig an stark transkribierten Bereichen integriert wurde oder mehrere Genkopien integriert wurden (Archer *et al.*, 1994).

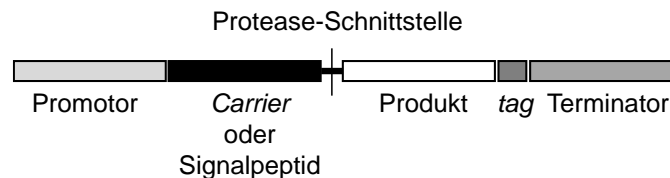


Abb. 1.1: Schematischer Aufbau der DNA einer Expressionskassette für die Produktion heterologer Proteine in filamentösen Pilzen.

Als Promotoren werden meist endogene Promotoren eingesetzt (Su *et al.*, 2012). Wie bei den meisten Expressionssystemen stehen dabei konstitutive und induzierbare Promotoren zur Verfügung. Zu den am häufigsten verwendeten Promotoren zählen der *glaA*-Promotor (α -Glucoamylase) in *A. niger* (Wiebe *et al.*, 2001), der *cbh1*-Promotor (Cellobiohydrolase 1) in *T. reesei* (Keränen & Penttilä, 1995) oder der *alcA*-Promotor (Alkoholdehydrogenase) in *A. nidulans* (Ward *et al.*, 1992). Konstitutive Promotoren sind z. B. der *gpdA*-Promotor (Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) in *A. nidulans* (Punt *et al.*, 1990) oder der *pki1*-Promotor in *Trichoderma spp.* (Montero-Barrientos *et al.*, 2007). Ein entscheidendes Problem bei der Verwendung der endogenen Promotoren ist die komplexe Regulation, welche nicht in allen Fällen erforscht ist. Viele der Promotoren weisen zusätzlich eine Katabolitrepression durch Glucose auf, wodurch die Produktion erschwert ist (Nevalainen *et al.*, 2005).

Die übliche Vorgehensweise für die Produktion und Sekretion heterologer Proteine ist entweder die N-terminale Fusion mit einem Signalpeptid oder einem gut sekretierten, pilzeigenen Protein, welches als *Carrier*-Protein dient und so das Produkt aus der Zelle dirigiert. Weitere Vorteile eines *Carrier*-Proteins sind die Stabilisierung der mRNA und der Schutz vor produktabbauenden Proteasen (Nevalainen *et al.*, 2005). Ein hierfür häufig eingesetztes Protein ist bei *A. niger* das Stärke-abbauende Enzym Glucoamylase (Gouka *et al.*, 1997; MacKenzie & Kraunsoe, 1998). Für die Abspaltung des *Carrier*-Proteins wird zusätzlich eine Protease-Schnittstelle zwischen den beiden Proteinen eingeführt. Bei der hierfür verwendeten Protease handelt es sich meist um eine KEX2-ähnliche Protease, welche noch während der Sekretion zur Abspaltung des *Carriers* führt (MacKenzie & Kraunsoe, 1998; Rasmussen-Wilson *et al.*, 1997; Spencer & Jeenes, 1998), da die Protease im trans-Golgi-

Netzwerk lokalisiert ist (Jalving *et al.*, 2000). Gleichzeitig können auch in-vitro-Ansätze für die Abspaltung verwendet werden, wie z. B. im Fall der TEV-Protease (*Tobacco Etch Virus*) (Sun *et al.*, 2011). In *T. reesei* wird häufig die Signalsequenz der Cellulase CBHI (Cel7a) verwendet (Schuster & Schmoll, 2010). Diese wird meist noch in der Zelle wieder entfernt, sodass lediglich das heterologe Protein sekretiert wird.

1.4 Wachstum von filamentösen Pilzen

1.4.1 Wachstum von Hyphen

Die zylinderförmigen Hyphen von filamentösen Pilzen wachsen durch die apikale Verlängerung der Hyphe (Bartnicki-Garcia & Lippman, 1969). Sie besitzen ein durchgehendes, aber septiertes Cytoplasma. Die Pilzhyphe besteht aus einer Plasmamembran, welche von einer Zellwand umgeben ist. Die Verlängerung der Hyphe geschieht durch die Ablagerung von neuer Plasmamembran und Zellwandbestandteilen an der Hyphenspitze durch Exocytose von sekretorischen Vesikeln (siehe Abschnitt 1.4.3). Das Myzel von Pilzen entsteht durch die subapikale Verzweigung der Hyphen, wodurch ein baumkronenähnliches Geflecht entsteht (Papagianni, 2004).

Die Zellwand von Pilzen besteht hauptsächlich aus Polysacchariden und Glykoproteinen (Bartnicki-Garcia, 1968). Bei den Polysacchariden handelt es sich um Chitinfilamente sowie $\beta(1,3)$ - und $\beta(1,6)$ -Glucane, welche in einer gelartigen Matrix aus $\alpha(1,3)$ -Glucanen und Glykoproteinen eingebettet sind (Hunsley & Burnett, 1970). Das für die Zellwand benötigte Chitin wird direkt an der Membran durch Chitinsynthasen aufgebaut, indem die Einzelbausteine auf der Membranninnenseite angenommen und an der äußeren Seite der Membran polymerisiert werden. $\beta(1,3)$ -Glucane werden ebenfalls an der Membran durch den Glucansynthasekomplex (GSC) erzeugt (Riquelme, 2013).

In der Hyphenspitze befindet sich der sogenannte Spitzenkörper. Dieser ist unter anderem aus verschiedenen Vesikeln, Ribosomen, Microtubuli und Actin zusammengesetzt. Im Spitzenkörper akkumulieren zunächst alle Vesikel, welche zu sekretierendes Material enthalten, bevor sie mit der Plasmamembran fusionieren. Der Spitzenkörper funktioniert daher als Vesikelversorgungszentrum (*vesicle supply center*, VSC). Es wurde außerdem vorgeschlagen, dass der Spitzenkörper eine Rolle in der Organisation von Microtubuli spielt (Riquelme, 2013). Das stark regulierte, polare Wachstum basiert auf dem Vorkommen bestimmter Proteine an der Hyphenspitze, welche als Marker oder Polaritätsfaktoren dienen

(Higashitsuji *et al.*, 2009). Die Organisation der Hyphenstruktur wird vom Cytoskelett sichergestellt, welches für die Positionierung der Organellen und das gerichtete Wachstum verantwortlich ist. Das pilzliche Cytoskelett besteht aus Microtubuli, Actin, Motorproteinen und Septinen (Riquelme, 2013).

1.4.2 Wachstum in submerser Kultur

Filamentöse Pilze können in Flüssigkultur generell in zwei Morphologieformen vorkommen: als freies Myzel oder in Pelletform. Bei Pellets handelt es sich um sphärische Strukturen unterschiedlichen Durchmessers. Sie entstehen durch die Aggregation der ausgekeimten Sporen und ihre Bildung wird durch zahlreiche Parameter beeinflusst, darunter die Scherbeanspruchung, Zusammensetzung und pH-Wert des Mediums, Inokulumgröße und die Begasungsrate. Vorteile von Pelletwachstum sind unter anderem die geringe Viskosität der Kulturbrühe. Der große Nachteil bei Pellets ist, dass das Innere der Pellets zumeist abgestorbene Zellen enthält, da der Stoffübertrag ins Innere nicht gewährleistet ist (Prosser & Tough, 1991).

Freies Myzel führt zwar nicht zu Limitierungen in Bezug auf den Stoffübertrag, besitzt jedoch andere Nachteile. Bilden sich lange Filamente aus, so können sich diese um die in der Kulturbrühe eingetauchten Fermenterbauteile wickeln und so die Homogenität der Brühe negativ beeinflussen. Die Kultur ist hochviskos und besitzt im Gegensatz zu Kulturen mit Pellets nicht-Newton'sches Fließverhalten. Dies führt zum Beispiel zu Problemen bei der Begasung, da sich die Luftblasen nicht homogen in der Kultur verteilen können (Papagianni, 2004).

Das Wachstum einer Kultur mit freiem Myzel basiert auf der linearen Wachstumsgeschwindigkeit der Einzelhyphen. Dennoch zeigt die Biomasseentwicklung solch einer Kultur den typischen Verlauf einer mikrobiellen Kultur (Goudar & Strevett, 1998), welche auf der Spaltung einer Mutterzelle in zwei Tochterzellen basiert (Abb. 1.2).

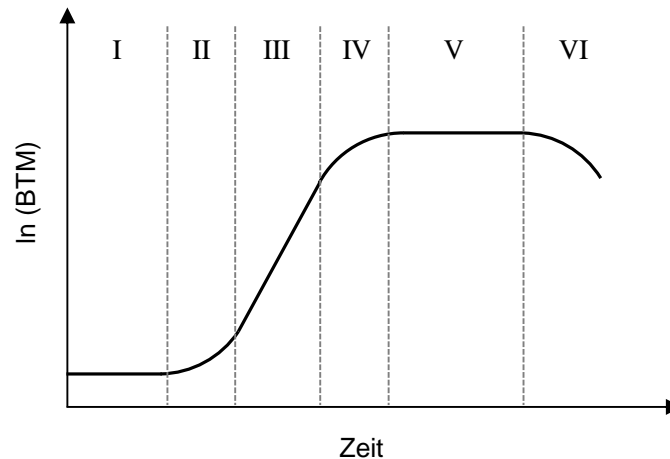


Abb. 1.2: Wachstumsphasen bei bakteriellen bzw. mikrobiellen Kulturen. (I) lag-Phase, (II) Übergangsphase I, (III) exponentielle Phase, (IV) Übergangsphase II, (V) stationäre Phase, (VI) Absterbephase (eigene Darstellung gemäß Chmiel, 2005)

Nach Animpfen der Kultur findet zunächst die lag-Phase statt. Im Falle der Pilzkultur keimen die Sporen aus und die Zellen passen sich an das Medium an. Anschließend erhöht sich die spezifische Wachstumsrate (Übergangsphase I) und erreicht in der exponentiellen Phase ihr Maximum. Diese maximale spezifische Wachstumsrate (μ_{\max}) bleibt während dieser Phase konstant, wird durch die molekularen Vorgänge vom Spitzenwachstum definiert und hängt von der Transportgeschwindigkeit innerhalb der Hyphe ab (Prosser, 1995). Der Grund für das exponentielle Wachstum der Kultur trotz nur linearer Wachstumsgeschwindigkeit der Einzelhyphen ist die exponentielle Bildung von neuen Verzweigungen der Hyphen. Die Bildung neuer Biomasse und neuer Hyphen stehen daher proportional zueinander (Trinci, 1974). In der exponentiellen Phase werden wachstumsgekoppelte Produkte wie Primärmetabolite (z. B. Zitronensäure) oder katabolische Enzyme gebildet (Nielsen, 1992). Treten erste Limitierungen auf, verringert sich die spezifische Wachstumsrate (Übergangsphase II). In der stationären Phase bilden sich gleich viele Zellen wie abgebaut werden und die Biomasse bleibt bei einem konstanten Wert. In dieser Phase werden Sekundärmetabolite gebildet (Calvo *et al.*, 2002). Anschließend beginnt die Absterbephase, in welcher es zur Autolyse kommt (Prosser & Tough, 1991).

Die Wachstumskinetik von Pilzkulturen lässt sich genauso wie bei mikrobiellen Kulturen mit der Monodkinetik beschreiben (Gleichung 1).

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{S}{K_S + S} \quad \text{Gleichung 1}$$

| | |
|-------------|---|
| μ | spezifische Wachstumsrate [h^{-1}] |
| μ_{max} | maximale spezifische Wachstumsrate [h^{-1}] |
| S | Substratkonzentration [g/L] |
| K_S | Sättigungskonstante, Substratkonzentration bei welcher $\mu = 0,5 \mu_{max}$ gilt |

Diese Gleichung besagt, dass die spezifische Wachstumsrate von der Substratkonzentration abhängig ist. Liegt das Substrat jedoch in einem Überschuss vor ($S \gg K_S$), so ist $\mu = \mu_{max}$. Dies ist in der exponentiellen Phase der Fall. Die Sättigungskonstante muss experimentell ermittelt werden und liegt zum Beispiel bei *Aspergillus* mit Wachstum auf Glucose bei 5,0 mg/L (Papagianni, 2004). Die Änderung der Biomasse (x) mit der Zeit (t) ist in Gleichung 2 definiert (Chmiel, 2005).

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{max} \cdot \frac{S}{K_S + S} \cdot x \quad \text{Gleichung 2}$$

| | |
|-------------|---|
| x | BTM-Konzentration [g/L] |
| t | Zeit [h] |
| μ_{max} | maximale spezifische Wachstumsrate [h^{-1}] |
| S | Substratkonzentration [g/L] |
| K_S | Sättigungskonstante, Substratkonzentration bei welcher $\mu = 0,5 \mu_{max}$ gilt |

Durch Lösung dieser Differentialgleichung und $S \gg K_S$ ergibt sich somit die Gleichung 3, welche das Wachstum in der exponentiellen Phase beschreibt (Chmiel, 2005).

$$x = x_0 \cdot e^{\mu_{max} \cdot t} \quad \text{Gleichung 3}$$

| | |
|-------------|--|
| x | BTM-Konzentration [g/L] |
| x_0 | BTM-Konzentration [g/L] bei $t = 0$ |
| μ_{max} | maximale spezifische Wachstumsrate [h^{-1}] |
| t | Zeit [h] |
| e | Euler'sche Zahl |

1.4.3 Proteinsekretion in filamentösen Pilzen

Einer der größten Vorteile von Pilzen für die Produktion von Proteinen ist die ausgeprägte Sekretionskapazität dieser Organismen, wodurch sehr hohe Proteinkonzentrationen im Kulturüberstand erhalten werden können (Cherry & Fidantsef, 2003). Das Dogma des pilzlichen Sekretionsweges sagt aus, dass sekretierte Proteine die Zelle an der wachsenden Hyphenspitze verlassen (Abb. 1.3).

Proteine, welche sekretiert werden sollen, werden zunächst in das endoplasmatische Retikulum (ER) translatiert. Hier werden sie gefaltet und erhalten posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierung, die Bildung von Disulfidbrücken, Phosphorylierung und die Zusammenlagerung verschiedener Untereinheiten im Fall von Multimeren. Anschließend verlassen die Proteine das ER in Vesikeln und werden über Microtubuli zum Golgi-Apparat transportiert (Conesa *et al.*, 2001). Hier kommt es zu weiteren Modifikationen wie der Änderung der Glykosylierung (Helenius & Aebi, 2004) und proteolytischer Spaltung (Jalving *et al.*, 2000; Redding *et al.*, 1991). Abschließend gelangen sie über sekretorische Vesikel an die wachsende Hyphenspitze, wo sie mit der Plasmamembran fusionieren (Exocytose) und dadurch freigesetzt werden (Taheri-Talesh *et al.*, 2008).

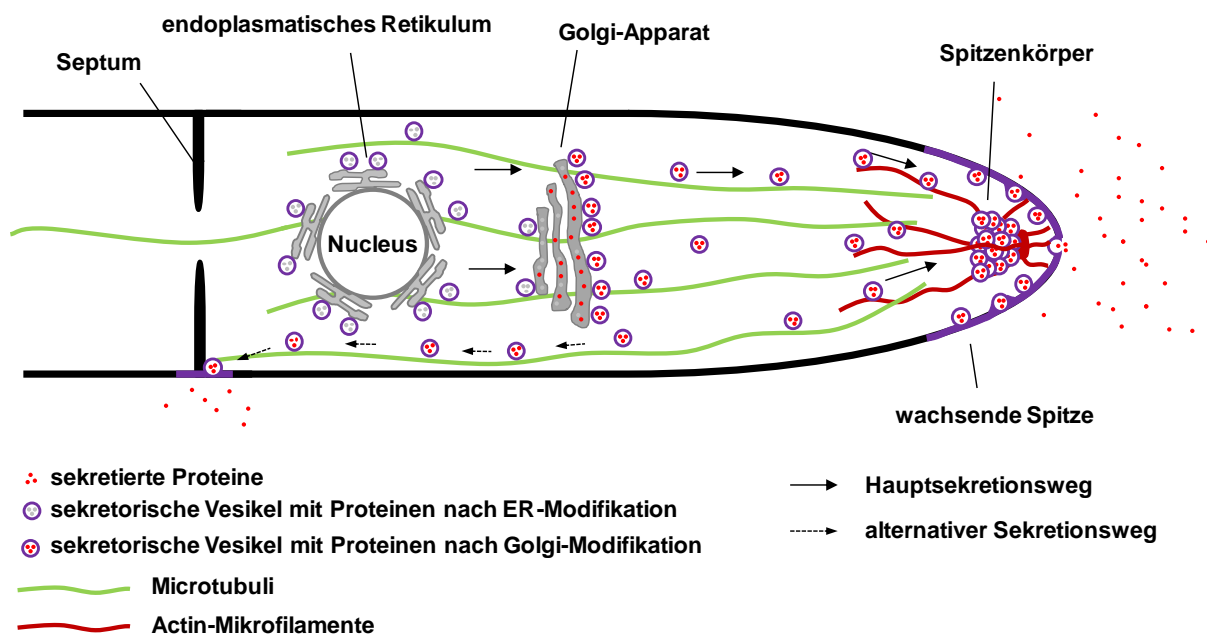


Abb. 1.3: Modell der Sekretion von Proteinen in filamentösen Pilzen

Dieser Sekretionsweg wurde bei zahlreichen filamentösen Pilzen gezeigt. So wurde die apicale Sekretion der α -Glucoamylase von *A. niger* nachgewiesen (Wosten *et al.*, 1991). Dies wurde durch die Fusion der Glucoamylase mit GFP bestätigt (Gordon *et al.*, 2000a, b). Auch die Proteinase EPB von *T. reesei* wird an der wachsenden Hyphenspitze sekretiert (Nykanen *et al.*, 1997). Die stark sekretierte Cellobiohydrolase I (CBHI) von *T. reesei* wird zusätzlich auch in älteren Bereichen der Hyphe sekretiert (Nykanen *et al.*, 1997). Dies zeigt auf, dass es wahrscheinlich neben dem Hauptsekretionsweg auch einen alternativen Sekretionsweg gibt. Diese Hypothese wird unterstützt durch den Sekretionsweg der α -Amylase in *A. oryzae*, in welcher die Sekretion eines EGFP-Fusionsproteins an Septen nachgewiesen wurde. Für die

Sekretion wurde lediglich Microtubuli benötigt, jedoch keine zusätzlichen Actin-Filamente, wie es beim Hauptsekretionsweg der Fall ist (Hayakawa *et al.*, 2011). Die Hypothese eines zusätzlichen Sekretionsweges findet in der pilzlichen Forschungsgemeinschaft immer mehr Anklang (Read, 2011).

Der Sekretionsweg ist ein in Eukaryoten konservierter Mechanismus und beginnt mit der Erkennung des N-terminalen Signalpeptids, welches als Erkennungssequenz für die Sekretion gilt und das Protein in das ER einbringen soll. Als Modellorganismus wird hier meist die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* genutzt. Signalpeptide sind meist zwischen 15 und 50 Aminosäuren lang und bestehen aus drei Regionen (n-, h- und c-Region). Die N-terminale n-Region ist meist aus positiv geladenen Aminosäuren zusammengesetzt, die h-Region ist 7-16 Aminosäuren lang und besitzt einen hydrophoben Kern und die c-Region weist 4-6 polare Aminosäuren auf (Nothwehr & Gordon, 1990). Die Einführung des Zielproteins kann sowohl cotranslational (SRP-abhängiger Weg) als auch posttranslational (SRP-unabhängiger Weg) geschehen (Sakaguchi, 1997). Die cotranslationale Translokation des Zielproteins beginnt durch die Erkennung der Signalsequenz durch *signal recognition particles* (SRP), welche anschließend an ihren Rezeptor (SRPR) auf dem ER binden. Das Peptid wird danach über ein Sec61-Transloconkomplex in das ER-Lumen translatiert. Dabei wird die Signalsequenz durch Signalpeptidasen abgespalten (Nothwehr & Gordon, 1990). Der SRP-unabhängige Weg beginnt durch die Bindung des cytosolischen Chaperons Hsp70 an das Zielprotein, welches dadurch in einem ungefalteten Zustand verbleibt. Anschließend gelangt das Zielprotein über die Interaktion mit einem Komplex bestehend aus den Proteinen Sec62/72/73 über Sec61 und das ER-Chaperon BiP (*binding protein*) in das ER-Lumen (Sakaguchi, 1997). Die Wahl des Weges wird durch die Hydrophobizität des Signalpeptids bestimmt, wobei weniger hydrophobe Signale über den SRP-unabhängigen Weg in das ER-Lumen gelangen (Ng *et al.*, 1996).

Nach der Translokation in das ER-Lumen interagieren Chaperone mit dem Zielprotein, wodurch die korrekte Faltung erreicht werden soll. Es gibt zwei Chaperon-Systeme, welche ungefaltete Proteine erkennen und binden. Das Calnexin/Calreticulin-System erkennt N-glykosylierte Oligosaccharidstrukturen auf Peptiden, welche als Bindungsstellen dienen (Molinari *et al.*, 2005). Das zweite Chaperon-System basiert auf der Erkennung von hydrophoben Peptidbereichen durch das Hsp70-Chaperon BiP (Flynn *et al.*, 1991). Zusätzlich zu diesen Chaperon-Systemen interagieren PPIasen (Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerasen) mit dem Zielprotein und helfen so bei der Faltung (Tremmel *et al.*, 2007). Eine weitere Modifikation, welche im ER stattfindet ist die Glykosylierung (Geysens *et al.*, 2009).

Das ER besitzt ein ausgeprägtes Qualitätskontrollsystem, um die Produktion falsch gefalteter Proteine zu verhindern. Kommt es zu einer Anhäufung ungefalteter Proteine im ER (ER-Stress), so wird die sogenannte *unfolded protein response* (UPR) eingeleitet. Durch eine komplexe Regulation wird die Sekretionskapazität erhöht, indem die ER-Oberfläche vergrößert, die Faltungskapazität erhöht, der Transport von ER zum Golgi-Apparat umstrukturiert und der ER-assoziierte Proteinabbau (ERAD, *ER-associated degradation*) initiiert wird (Heimel, 2015). Während des ERAD werden falsch gefaltete Proteine ubiquitiniert und in das Cytosol transportiert, wo sie vom 26S-Proteasom abgebaut werden (Carvalho *et al.*, 2011). Alternativ können falsch gefaltete Proteine zu den Vakuolen transportiert und abgebaut werden (Yoon *et al.*, 2010).

1.5 Optimierung der Proteinproduktion bei filamentösen Pilzen

Das Erhöhen des Ertrags bei der Produktion von heterologen Proteinen in filamentösen Pilzen kann sowohl durch gentechnische als auch prozesstechnische Maßnahme erreicht werden. Häufig führt nur die Kombination beider Ansätze zum Erfolg, weswegen ein grundlegendes Verständnis der Zellbiologie als auch des Produktionsprozesses notwendig ist.

1.5.1 Gentechnische Maßnahmen

Gentechnische Maßnahmen können entweder durch rationales Design, indem bestimmte Gene ausgeschaltet oder überexprimiert werden, oder Zufallsmutagenese durchgeführt werden. Bei der Zufallsmutagenese können bei geeigneten Screeningverfahren in kurzer Zeit die Erträge vervielfacht werden. Obwohl dabei häufig der zugrunde liegende Mechanismus nicht bekannt ist, ist dies das Standardverfahren in der industriellen Biotechnologie (Nevalainen & Peterson, 2014).

Beim rationalen Design gibt es zahlreiche Ansätze, die zur Ertragssteigerung führen können. Neben der Optimierung der Genexpression sind auch eine verbesserte Sekretion der Proteine oder eine verringerte Proteaseaktivität im Kulturüberstand von großem Interesse.

Eine Erhöhung der Genkopie stellte bislang die einfachste Methode zur Erhöhung der Genexpression dar (Verdoes *et al.*, 1993). Die Genexpression kann außerdem durch die Verwendung von unterschiedlichen Promotoren verbessert werden (Allgaier *et al.*, 2010). Auch die Veränderung der Promotoren in Bezug auf Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren kann die Genexpression positiv beeinflussen (Wang *et al.*, 1994). Eine

ähnliche Strategie sieht die Überexpression von aktivierenden Elementen vor, wodurch mehr mRNA gebildet wird (Su *et al.*, 2012).

Ein erster Schritt bei der Produktion heterologer Proteine ist häufig die Anpassung des Gens an die *Codon usage* des Produktionsorganismus, wodurch eine eventuelle Limitierung durch die Verwendung seltener Codons vermieden werden soll. Eine Codon-Optimierung kann hierbei die Produktion um ein Vielfaches erhöhen (Gooch *et al.*, 2008; Te'o *et al.*, 2000). Nach der Erzeugung der mRNA spielt ihre Stabilität eine wichtige Rolle (Koda *et al.*, 2005).

Die darauffolgenden Translation und Sekretion bietet ebenfalls viel Raum für Optimierungen. Eine korrekte Auswahl des Signalpeptids oder des *Carrier*-Proteins kann sich entscheidend auf die Translokation des Peptids in das ER auswirken (Su *et al.*, 2012). Für die Verringerung der Größe des Fusionsproteins, welche eine Limitierung darstellen kann, wurden bereits gekürzte Varianten von Fusionsproteinen eingesetzt (Jeenes *et al.*, 1993; Nyssönen *et al.*, 1993; Rasmussen-Wilson *et al.*, 1997).

Ein weiteres Problem bei diesem Schritt ist die Überlastung der Zelle durch die Synthese des heterologen Proteins. Dabei kann es dazu kommen, dass die Proteine nicht korrekt gefaltet werden, in Folge dessen sie durch das Qualitätskontrollsystem des ER abgebaut werden (siehe Abschnitt 1.4.3). Eine Co-Expression von Chaperonen und Foldasen setzt an diesem Punkt an und verhilft den Proteinen bei der korrekten Faltung (Ward, 2012).

Eine der größten Herausforderungen bei der Produktion von heterologen Proteinen in filamentösen Pilzen ist das Unterbinden der Sekretion von Proteasen. Dies kann zum vollständigen Abbau des Produktes führen. Für die Erzeugung von proteasedefizienten Stämmen wurden zahlreiche Strategien verwendet. Eine in der Industrie übliche Vorgehensweise ist die Durchführung einer Zufallsmutagenese und dem anschließenden Screening auf Proteasedefizienz (Archer *et al.*, 1994). Ist man im Besitz von großen Screeningkapazitäten, so können in kurzer Zeit Zielstämme generiert werden. In diesem Fall liegt das Interesse nicht an der Erforschung des danach zugrunde liegenden Mechanismus, welcher zur Proteasedefizienz führt. In anderen Ansätzen wird durch genetische Verfahren versucht, die Genexpression der Proteasen zu verhindern. Eine Möglichkeit ist hierbei Transkriptionsfaktoren zu mutieren oder deletieren, welche zur Expression der Proteasegene führen (Mattern *et al.*, 1992). Durch diese Herangehensweise kann in einigen Fällen die Genexpression mehrerer Proteasegene zugleich verhindert werden. Eine ähnliche Strategie ist die Identifizierung der Proteasegene und anschließende Deletion aller beteiligter Gene (Yoon *et al.*, 2011). Diese Strategie ist die aufwendigste Möglichkeit, proteasedefiziente Stämme zu generieren.

Ein Ansatz der Erhöhung der Sekretion ist die Verwendung morphologischer Mutanten. Die Idee basiert auf dem allgemeinen Sekretionsmodell, welches besagt, dass Proteine an den Hyphenspitzen bzw. aktiv wachsenden Zellabschnitten sekretiert werden. Durch sogenannte *Hyperbranching*-Mutanten wird eine wesentlich höhere Anzahl an Hyphenspitzen erzeugt, wodurch theoretisch die Sekretionskapazität erhöht werden könnte (Conesa *et al.*, 2001). Auch sphärisch wachsende Mutanten können das Sekretionslevel erhöhen, da die gesamte Oberfläche aktiv wächst (Lee *et al.*, 1998).

1.5.2 Prozesstechnische Maßnahmen

Das Wachstum und die Produktion werden bei submersen Kultivierungen durch zahlreiche Parameter wie z. B. Medienzusammensetzung, Inokulumkonzentration, pH-Wert, Temperatur, Begasungsrate, Scherstress und viele andere Parameter beeinflusst (Wang *et al.*, 2005).

Der pH-Wert des Mediums kann verschiedene Auswirkungen auf die Kultur haben. Da Proteasen in einigen Fällen nur unter bestimmten pH-Werten sekretiert werden bzw. aktiv sind, kann ein günstig gewählter pH-Wert die Proteaseaktivität drastisch verringern (O'Donnell *et al.*, 2001). Der pH-Wert kann ebenfalls einen Einfluss auf die Morphologie der Kultur und somit auf die Rheologie haben (Wang *et al.*, 2005).

Die Zusammensetzung des Mediums hat einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbeute. Zum einen werden die verwendeten Promotoren durch unterschiedliche Zuckerquellen induziert oder reprimiert (Archer & Peberdy, 1997), zum anderen hängt die Regulation der Proteasegene häufig von der Konzentration der Stickstoff-, Kohlenstoff-, Phosphor- oder Schwefelquellen im Medium ab (van den Hombergh *et al.*, 1997).

Eine gängige Methode zur Erhöhung der Produktausbeute ist die Verringerung der Kultivierungstemperatur (Yoon *et al.*, 2003). Die Idee dahinter ist die Verlangsamung der biochemischen Abläufe in der Zelle, insbesondere die der Transkription aber auch Translation, wodurch deren Raten verlangsamt und so an die vermeintlich langsamere Rate der darauffolgenden Faltung der heterologen Proteine angepasst werden. Auch die Wahl des Kultivierungsverfahrens kann einen Einfluss auf die Produktbildung haben. In der Bioprozesstechnik wird im Wesentlichen zwischen drei Verfahren unterschieden: Batch-, Fed-Batch und kontinuierlichen Verfahren. Beim diskontinuierlichen Batch- oder Satzverfahren wird in einem geschlossenen System kultiviert. Sämtliches Substrat befindet sich von Beginn an im Reaktor und lediglich Säure bzw. Lauge, Entschäumer und Luft bzw. Sauerstoff werden dem System während der Kultivierung hinzugefügt (Chmiel, 2005).

Dem Batch-Verfahren steht das kontinuierliche Verfahren entgegen. Bei diesem offenen System wird dem Reaktor durchgängig Substrat bzw. Medium zugeführt, aber auch Biomasse und Medium entnommen, sodass sich ein Gleichgewicht einstellt, bei dem im Idealfall die Konzentration der Biomasse konstant ist (Chmiel, 2005).

Eine Mischung aus diesen beiden Verfahren stellt das Fed-Batch-Verfahren dar. Dieses besteht aus einer Batch-Phase und einer Zufütterungsphase (Feeding-Phase). Diese Betriebsführung ist partiell kontinuierlich und teiloffen. Die Batch-Phase ist identisch mit einem üblichen Batch-Verfahren, in welchem sich Biomasse mit einer maximalen spezifischen Wachstumsrate μ_{\max} bildet. In der anschließenden Feedingphase wird Substrat hinzugefüttert, sodass zwar das exponentielle Wachstum erhalten bleibt, jedoch nur mit einer verringerten spezifischen Wachstumsrate μ_{set} . Fed-Batch-Verfahren werden in der industriellen Biotechnologie in Fällen eingesetzt, bei denen hohe Substratmengen umgesetzt werden sollen. Würde man diese Mengen in einem Batch-Verfahren von Beginn an einsetzen, so würde sich häufig eine Substratinhibierung einstellen, wodurch die Kultur nicht wachsen würde (Wang *et al.*, 2005). Mit dem Fed-Batch-Verfahren wird diese Inhibierung umgangen, da im Idealfall sämtliches hinzugegebenes Substrat sofort von den Zellen umgesetzt wird, wodurch die Substratkonzentration im Idealfall konstant bei sehr geringen Werten verbleibt (Gnoth *et al.*, 2008). Besteht eine Katabolitrepession bei der Produktion, so kann diese mit einem Fed-Batch-Verfahren ebenfalls vermieden werden (Szabó *et al.*, 1996).

Eine Gegenüberstellung der charakteristischen Verläufe von Batch- und Fed-Batch-Verfahren ist Abb. 1.4 zu entnehmen.

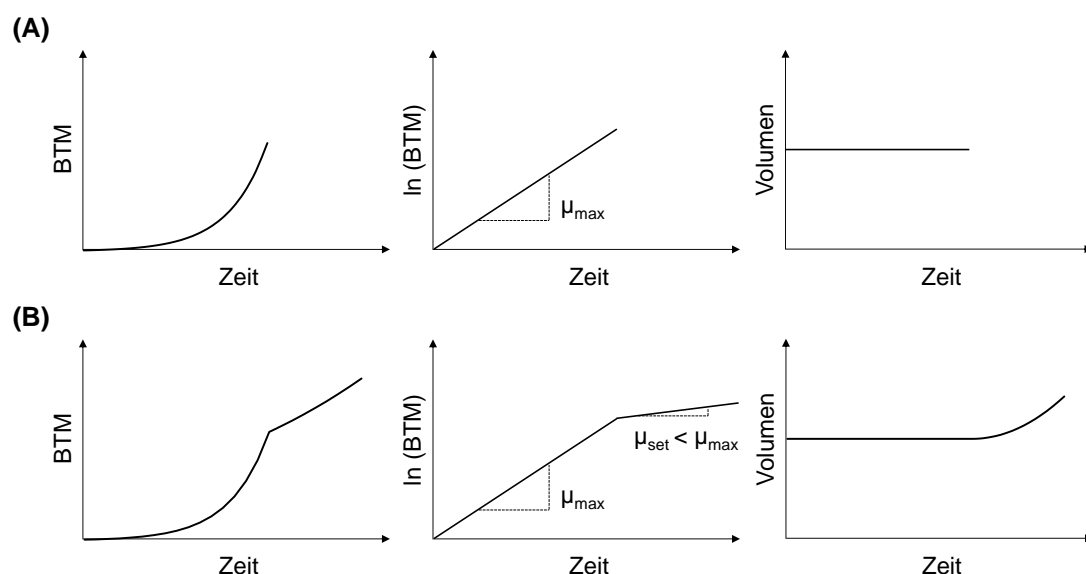


Abb. 1.4: Prinzipdarstellung der Verläufe der Biotrockenmasse (BTM) sowie des Arbeitsvolumens im Reaktor bei einem Batch- (A) und einem Fed-Batch-Verfahren (B). Eigene Darstellung gemäß Chmiel (2005) und Gnoth *et al.* (2008).

1.6 *Neurospora crassa*

1.6.1 Lebenszyklus

In dieser Arbeit soll der Schimmelpilz *Neurospora crassa* für die Produktion heterologer Proteine verwendet werden. Hierbei handelt es sich um einen filamentösen Pilz, welcher zur Abteilung der Schlauchpilze (*Ascomycota*) gezählt wird. Er wurde bereits 1843 zum ersten Mal als Kontaminant von Bäckereien in Frankreich beschrieben (Davis & Perkins, 2002). Seinen Namen verdankt *N. crassa* den nervenartigen Strukturen auf seinen sexuell gebildeten Sporen (Abb. 1.5) sowie der lateinischen Bezeichnung für das Wort „dick“ bzw. „dicht“, da die Hyphen im Vergleich zu anderen Schimmelpilzen einen großen Durchmesser besitzen (Shear & Dodge, 1927). In der freien Natur kommt *N. crassa* meist auf verbrannter Vegetation vor. Zu seinem Verbreitungsgebiet zählen weltweit tropische und subtropische Gebiete, aber auch westliche Regionen Nordamerikas, Südeuropa wie Portugal und Spanien und sogar die Schweiz (Jacobson *et al.*, 2006). Das Genom von *N. crassa* wurde bereits 2003 sequenziert und umfasst 43 Mbp mit ca. 10.000 proteinkodierenden Genen (Galagan *et al.*, 2003). Für den Großteil aller Gene wurde eine Knock-out-Bibliothek erzeugt (Colot *et al.*, 2006).

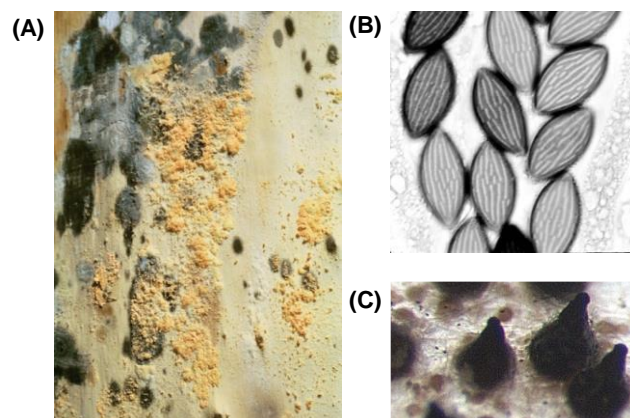


Abb. 1.5: *N. crassa* auf einem verbrannten Baumstamm (A), Ascosporen (B) und Fruchtkörper (C) von *N. crassa*. Quellen der Fotos: FGSC (A, B), Martin Weichert (C).

N. crassa besitzt sowohl einen asexuellen als auch einen sexuellen Lebenszyklus (Abb. 1.6). Die asexuellen Vermehrungseinheiten dieses Pilzes sind Sporen (Makrokonidien), welche einen oder mehrere haploide Kerne enthalten. Unter geeigneten Wachstumsbedingungen keimen die Sporen aus und es entstehen Hyphen, welche sich durch Spitzenwachstum verlängern und durch Verzweigungen weitere Hyphen hervorbringen. Das so entstandene Myzel besteht nicht aus voneinander abgetrennten Zellen sondern teilt sich ein gemeinsames

Cytosol. Die Hyphenabschnitte sind zwar durch Septen getrennt, Cytoplasma, Organellen und Zellkerne können aber über die Septenporen durch die Hyphen wandern. Sind die Nährstoffe verbraucht, so beginnt der Pilz Lufthyphen und anschließend Sporen zu bilden. Diese Sporen verleihen dem Pilz durch ihre Carotenoide seine typische orangene Färbung. Dadurch, dass diese Sporen mehrere Kerne enthalten können, kann es unter bestimmten Umständen dazu kommen, dass diese Kerne genetisch unterschiedlich sind, wodurch der später ausgebildete Pilz das genetische Material mehrerer Kerne enthält. In diesem Fall spricht man von einem Heterokaryon. Stämme, welche nur auf einer Kernart basieren, werden Homokaryen genannt (Davis, 2000).

Unter Stickstoff-limitierenden Bedingungen kann *N. crassa* auch einen sexuellen Zyklus durchlaufen. Die Elternstämme müssen dabei einen unterschiedlichen Kreuzungstyp (*mating type*) besitzen. Das Resultat einer Kreuzung sind Asci (Sporensäcke), welche je acht sexuelle Ascosporen enthalten. Diese stark melanisierten Sporen stellen das Dauerstadium des Pilzes dar und können durch Hitze (20 min bei 60 °C) aktiviert werden. Jede Ascospore geht auf nur einen Zellkern zurück, wodurch die Nachkommen immer homokaryotisch sind. Kreuzungen ermöglichen die Rekombination von Genen und somit auch klassisch genetische Studien (Davis, 2000).

N. crassa wird seit Jahrzehnten als Modellorganismus für verschiedene Fragestellungen verwendet. Bereits 1941 nutzten Beadle und Tatum *N. crassa* in ihren Arbeiten zur „Ein-Gen-ein-Enzym“-Hypothese (Beadle & Tatum, 1941), für welche sie 1958 den Nobelpreis erhielten. Heutzutage wird *N. crassa* unter anderem als Modellorganismus für die Untersuchung von Zellfusionen (Fleissner *et al.*, 2008), polarem Wachstum (Riquelme *et al.*, 2011) oder circadianer Rhythmik (Hurley *et al.*, 2015) verwendet. Zum einen erleichtert die Knock-out-Bibliothek die Untersuchung von Deletionsmutanten (Colot *et al.*, 2006). Zum anderen können Mutationen oder Deletionen einfach durch Kreuzung kombiniert werden, wodurch Mehrfachmutanten erzeugt werden.

Carrier-Protein in einer gekürzten Form (376 bp) verwendet, als Promotor wurde der native Glucoamylasepromotor *Pgla* eingesetzt. Zwischen *Carrier* und heterologen Protein wurde eine Kex-2-Proteaseschnittstelle für die Abspaltung des Zeamatins eingebaut. Mit dieser Strategie wurde eine Ausbeute von 10 µg/L erreicht (Rasmussen-Wilson *et al.*, 1997).

Sowohl die Produktion von Präprochymosin als auch jene von Zeamatin basierte auf der heterologen Integration der Expressionskassette an zufälligen Loci. Im Gegensatz hierzu wurde für die Produktion von Influenza A Hämagglutinin und Neuraminidase die Expressionskassette an den *his-3*-Locus integriert (Allgaier *et al.*, 2009). Die Expressionskassette enthielt den *A. niger* Glucoamylase-Promotor (*PglaA*). Bei der Expressionskassette von Hämagglutinin wurde die native Signalsequenz durch das Cel12A-Signalpeptid der Endoglucanase III aus *T. reesei* ersetzt, die Neuraminidase enthielt ihre native Signalsequenz. Eine Angabe der erreichten Konzentration erfolgte jedoch nicht.

Einen ausführlichen Vergleich von verschiedenen Promotoren und Terminatoren lieferte die Arbeit von Allgaier *et al.* (2010) bei der Produktion von boviner RNase A sowie der endogenen RNase N1. Als Signalpeptid wurde eine Sequenz der alkalischen Phosphatase des filamentösen Pilzes *Acremonium chrysogenum* verwendet. Zu den vergleichenden *N. crassa*-Promotoren gehören der *ccg-1*-, der Enolase- und der *cfp*-Promotor (*cytoplasmic filament protein*). Letztgenannter Promotor führte dabei zu der höchsten Ausbeute mit ca. 0,4 mg/L. Der Terminator hatte keinen Einfluss auf die Produktausbeute (Allgaier *et al.*, 2010).

1.7 Antikörper

1.7.1 Aufbau und Funktion

Antikörper sind ein zentraler Bestandteil des erworbenen Immunsystems von Wirbeltieren ab der Überklasse der Kiefermäuler. Nach dem Kontakt des Immunsystems mit bekannten Antigenen werden sie von spezialisierten B-Lymphozyten in das Blutplasma abgegeben, wo sie die Antigene wie zum Beispiel Proteine, Polysaccharide oder Lipopolysaccharide mit hoher Affinität binden. Diese Strukturen befinden sich auf der Oberfläche von Bakterien oder Viren. Antikörper können mehrere Funktionen haben. Eine der Hauptaufgaben ist die Bindung und somit Markierung von Pathogenen, wodurch diese von Immunzellen oder dem Komplementsystem erkannt und bekämpft werden können. Neben dieser sogenannten Opsonierung können Antikörper auch Toxine binden und somit neutralisieren, da diese somit

nicht mehr an andere Proteine binden können und ihre Wirkung verlieren (Janeway & Travers, 2002).

Antikörper (Immunglobuline, Ig) werden in fünf Klassen (Isotypen) IgG, IgM, IgA, IgD und IgE unterteilt. Die unterschiedlichen Klassen stellen dabei verschiedene Abwehrfunktionen dar. Den größten Anteil im Blut bilden IgG-Moleküle, welche aus einem Heterodimer aus zwei schweren (*heavy chains*, H) und zwei leichten Ketten (*light chains*, L) bestehen, welche über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind (Janeway & Travers, 2002).

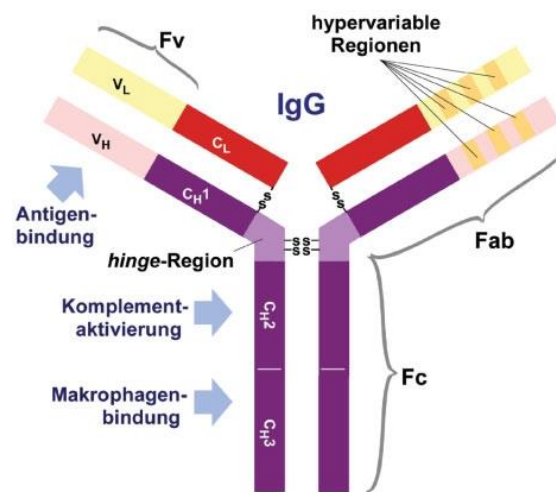


Abb. 1.7: schematische Darstellung und Funktionen eines IgG-Antikörpers (aus: Biol. unserer Zeit, Nr. 6, 34. Jahrgang 2004, S. 373)

Die leichten Ketten setzen sich aus einer konstanten (C_L) und einer variablen Domäne (V_L) zusammen und kommen in einer κ - und eine λ -Form vor. Die schweren Ketten besitzen ebenfalls eine variable Domäne (V_H), zusätzlich bestehen sie jedoch aus den konstanten Domänen C_{H1} , C_{H2} und C_{H3} . Die schweren Ketten sind über zwei Disulfidbrücken miteinander verknüpft (Scharnier- oder *hinge*-Region) und jede schwere Kette ist mit je einer leichten Kette über je eine Disulfidbrücke verbunden. Nach der Zusammenlagerung bilden sich drei Bereiche mit unterschiedlichen Funktionen aus. Die Antigenbindestelle (Fv, *fragment variable*) setzt sich aus V_H und V_L zusammen und ist Teil des Fab-Abschnittes (*fragment antigen binding*). Die C_{H2} und C_{H3} -Domänen bilden den Fc-Teil des Antikörpers aus (*fragment crystallizable*), welcher die Bindungsstellen für das Komplement und Makrophagen besitzt (Janeway & Travers, 2002).

Der für die Antigenbindung zuständige Fv-Teil besteht aus hypervariablen Regionen (HV1, HV2 und HV3) und Gerüstregionen. Diese Gerüstregionen (*framework region*, FR1, FR2, FR3 und FR4) zeigen nur eine geringe Variabilität auf und bilden die strukturelle Basis des Fv-Abschnittes. Nach korrekter Faltung und Zusammenlagerung der leichten und schweren Kette bildet sich die Antigenbindungsstelle aus, welche durch hypervariable komplementaritätsbestimmende Regionen dominiert wird (*complementarity determining regions*, CDR1, CDR2 und CDR3). Diese CDR-Abschnitte interagieren bei Bindung physikalisch mit dem Antigen (Janeway & Travers, 2002).

Die Ig-Isotypen unterscheiden sich in ihren konstanten Regionen und führen zur Bindung von verschiedenen Effektorzellen des Immunsystems und dadurch zu unterschiedlichen Immunreaktionen (Janeway & Travers, 2002).

1.7.2 Rekombinante Antikörper

In den vergangenen Jahrzehnten wurden zahlreiche veränderte Antikörpermoleküle vorgestellt. So wurde bereits früh festgestellt, dass die beiden Fab-Abschnitte enzymatisch vom Fc-Teil abgespalten werden können und dennoch ihre Bindungseigenschaften beibehalten (Michaelson & Natvig, 1972). Durch molekularbiologische Methoden folgte die Einführung verschiedenster Antikörperformate, wodurch zum einen die Größe der rekombinanten Antikörper verringert wurde, zum anderen konnten nun auch bakterielle Expressionssysteme für die Produktion genutzt werden, mit welchen die Produktion vollständiger Antikörper nicht möglich ist (Frenzel *et al.*, 2013). Abb. 1.8 zeigt eine Übersicht der häufigsten Antikörperformate auf.

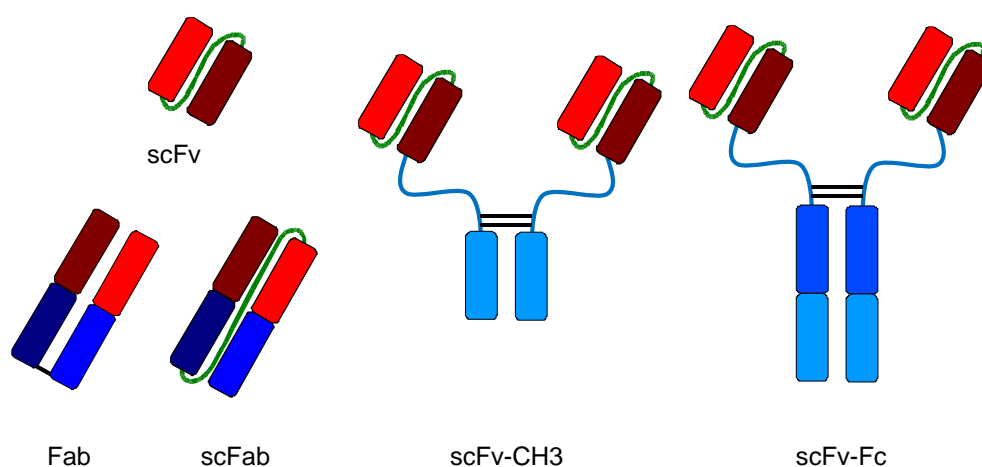


Abb. 1.8: Schematischer Aufbau verschiedener Antikörperfragmente. Geschwungene Linien stellen Polypeptidlinker dar, gerade schwarze Linien sind Disulfidbindungen (modifiziert nach Frenzel *et al.* 2013).

Die kleinste funktionelle Einheit üblicher Antikörperformate ist das scFv (*single chain fragment variable*, ca. 30 kD), bei welchem die V_H und die V_L -Domäne über einen synthetischen Polypeptidlinker verbunden sind und dadurch ein Monomer darstellen. Die Produktion solcher scFv ist bereits mit *E. coli* möglich (Bird *et al.*, 1988). Größere Formate sind Fab, welche entweder eine Disulfidbrücke enthalten oder analog zu scFv mittels eines Linkers in ein scFab umgewandelt wurden (Hust *et al.*, 2007). Fab und scFab enthalten im Gegensatz zu scFv auch die konstanten Regionen der schweren und leichten Ketten. All diese Antikörperformate besitzen keinen Fc-Teil und können daher in vivo keine Effektorfunktion ausüben. Über eine Fusion mit dem Fc-Teil, welcher entweder aus den C_H2 - C_H3 -Domänen (scFv-Fc) oder nur der C_H3 -Domäne besteht (scFv- C_H3) kann diese Effektorfunktion wieder hergestellt werden (Hu *et al.*, 1996; Powers *et al.*, 2001). Dabei können die rekombinanten Antikörper sowohl als Homo- als auch Heterodimer erzeugt werden, wodurch sich neue Verwendungsmöglichkeiten ergeben (Fournier & Schirmacher, 2012).

1.7.3 Anwendung von Antikörpern und rekombinanten Antikörperfragmenten

Antikörper stellen heutzutage einen wichtigen Bestandteil der modernen Medizin sowie der Diagnostik dar. Vollständige IgG-Moleküle werden bei Krebstherapien, aber auch bei bestimmten Infektionskrankheiten und als Impfstoffe eingesetzt. Für Anwendungen, bei denen das Immunsystem getriggert werden soll, wird der Fc-Teil benötigt, weswegen scFv und Fab nicht eingesetzt werden können (Frenzel *et al.*, 2013).

Wird diese Effektorfunktion jedoch nicht benötigt, so können auch die kleineren Antikörperfragmente eingesetzt werden. Zu den Vorteilen zählt zum Beispiel die geringe Größe von ca. 30 kD, wodurch sie tiefer in das Gewebe eindringen können als vollständige Antikörper (ca. 150 kD) und daher bei der Detektion eine wichtige Rolle spielen können (Blazek & Celer, 2003). Kleinere Antikörperformate werden jedoch meist nur für die Selektion von geeigneten Bindern aus Antikörperbibliotheken genutzt, um sie anschließend entweder in scFv-Fc-Fusionen oder vollständige IgG umzuwandeln (Steinwand *et al.*, 2013).

Abgesehen von der klinischen Anwendung spielen Antikörper eine Schlüsselrolle in der Proteindetektion, da sie durch ihre hohe Spezifität Zielproteine binden und so detektieren können, wodurch sie in Assays wie ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) oder Western Blots verwendet werden (Blazek & Celer, 2003).

1.7.4 Expressionssysteme für rekombinante Antikörper

Die Produktion rekombinanter Antikörper bzw. Antikörperfragmente wurde mittlerweile in allen gängigen Produktionssystemen erzielt. Der Unterschied zwischen den Systemen liegt in der Glykosylierung der Antikörper, der Ausbeute und der Fähigkeit verschiedene Formate zu produzieren. Bei der Produktion im Gram-negativen Bakterium *E. coli* wird der Antikörper in das Periplasma sekretiert, wo er sich korrekt faltet und sich Disulfidbrücken ausbilden können (Bothmann & Pluckthun, 2000). Die Isolierung des Proteins geschieht danach durch Aufschluss des Periplasmas oder aus dem Kulturüberstand, in welchen das Produkt meist über Zelllyse gelangt. In *E. coli* werden hauptsächlich nur kleinere Formate wie scFv, Fab und scFab produziert (Frenzel *et al.*, 2013). Auch über die Produktion von vollständigen IgG wurde bereits berichtet (Simmons *et al.*, 2002). Die am höchsten erzielten Ausbeuten beliefen sich auf 1,2 g/L bei einem scFv (Sletta *et al.*, 2004) und 2,5 g/L bei einem F(ab')₂ (Chen *et al.*, 2004). All diese Formate können aufgrund der fehlenden Glykosylierungsmaschinerie nicht glykosyliert werden, wodurch sie sich nicht für therapeutische sondern lediglich für diagnostische Zwecke eignen (Frenzel *et al.*, 2013).

Auch Gram-positive Bakterien können für die Produktion von Antikörperfragmenten eingesetzt werden. Der große Vorteil gegenüber Gram-negativen Bakterien ist das vorhandene Sekretionssystem, wodurch die Produkte in das Kulturmedium freigesetzt werden können (Frenzel *et al.*, 2013). Es gelten jedoch die gleichen Größenlimitierungen wie bei Gram-negativen Bakterien, wodurch bislang nur scFv und Fab produziert wurden. Die Ausbeuten unterschieden sich dabei stark. Während mit *Bacillus megaterium* scFv mit einer Ausbeute von ca. 0,4 g/L produziert wurden (Jordan *et al.*, 2007), konnten bei *Bacillus brevis* Titer von Fab-Fragmenten in einer Höhe von 100 mg/L erreicht werden (Inoue *et al.*, 1997).

Ein weiteres etabliertes System stellen Hefen und insbesondere *P. pastoris* dar. Im Gegensatz zu Bakterien können mit diesen Organismen auch vollständige IgG hergestellt werden. Hefen vereinen die Vorteile einer mikrobiellen Kultivierung mit den Vorzügen eukaryotischer Systeme wie zum Beispiel posttranslationaler Modifikationen (Frenzel *et al.*, 2013). Die produzierten Antikörper werden in das Kulturmedium sekretiert. Hierfür wird ein Fusionsprotein bestehend aus einem Signalpeptid (verantwortlich für die Sekretion) und dem Antikörper sekretiert. Für das Entfernen des Signalpeptids wird eine Proteaseschnittstelle wie zum Beispiel der Protease KEX2 eingeführt (Emberson *et al.*, 2005). Da Hefen ein nicht-humanes Glykosylierungsmuster besitzen, können auch hier die Antikörper nicht für therapeutische Zwecke eingesetzt werden. Durch die einfache Manipulierbarkeit von Hefen ist

es jedoch gelungen, Stämme mit menschlichem Glykosylierungsmuster zu erzeugen (Choi *et al.*, 2003). Die Ausbeute für scFv bewegt sich zwischen 70 mg/L (Gurkan *et al.*, 2004) und 250 mg/L (Eldin *et al.*, 1997). Durch die Optimierung des Kultivierungsprozesses und der Co-Expression von BiP (*immunoglobulin binding protein*) konnten in einem Bioreaktor sogar Ausbeuten von bis zu 8 g/L an scFv bei *P. pastoris* erreicht werden (Damasceno *et al.*, 2004). Fab-Fragmente konnten mit einem Titer von bis zu 0,5 g/L produziert werden (Gasser *et al.*, 2006). Vollständige IgG wurden mit einer Konzentration von 1,4 g/L produziert (Potgieter *et al.*, 2010). Diese vergleichbar hohen Ausbeuten und die Aussicht auf Produktionsstämme mit menschlicher Glykosylierungsmaschinerie machen dieses System zu einem wirtschaftlich interessanten Produktionsorganismus.

Filamentöse Pilze wurden bislang nur selten für die Produktion von Antikörpern bzw. Antikörperfragmenten eingesetzt. Obwohl sie generell in der Lage sind, hohe Mengen an Protein in das Kulturmedium zu sekretieren (Joosten *et al.*, 2003), wurde nur in wenigen Fällen über die Produktion von Antikörpern berichtet. Die bislang verwendete Strategie für die Sekretion der Antikörper ins Kulturmedium war die N-terminale Fusion des Produktes an ein sekretiertes endogenes Protein. Dies war bei *Aspergillus niger* das Enzym Glucoamylase und bei *Trichoderma reesei* das Enzym Cellobiohydrolase I (Frenken *et al.*, 1998). Nach einer KexB-vermittelten Abspaltung des Enzyms wurden bei *A. niger* IgG mit einer Konzentration von 1,2 g/L produziert (Ward *et al.*, 2004), scFv konnten mit einem Titer von ca. 100 mg/L in *A. niger* produziert werden (Sotiriadis *et al.*, 2001). In *T. reesei* wurden Ausbeuten an Fab von 150 mg/L erreicht (Nyyssönen *et al.*, 1993). Ein großes Problem bei filamentösen Pilzen stellen ebenfalls sekretierte Proteasen dar, welche zum Verlust des Produktes führen. Daher wurden für die Produktion proteasedefiziente Stämme entwickelt (Mattern *et al.*, 1992).

Auch Insektenzellen eignen sich für die Produktion von rekombinanten Antikörpern, da das dabei verwendete Vektorsystem lange heterologe Gensequenzen aufnehmen kann (mehr als 20 kbp). Auch bei diesem Produktionssystem werden die Produkte in das Kulturmedium sekretiert (Frenzel *et al.*, 2013). scFv konnten mit einem Titer von 32 mg/L in einem Bioreaktor produziert werden (Kretzschmar *et al.*, 1996). Auch IgG konnten erfolgreich mit Insektenzellen hergestellt werden, wobei die erreichte Konzentration bei bis zu 18 mg/L lag (Liang *et al.*, 2001). Ein Nachteil dieses Systems ist das von Säugetieren abweichende Glykosylierungsmuster, wodurch die Produkte potentielle Allergene darstellen (Hsu *et al.*, 1997).

Trotz hoher Herstellungskosten werden ca. 95 % aller zugelassenen therapeutischen Antikörper in Säugetierzellen hergestellt. Die Gründe hierfür sind korrekte Faltung und

Glykosylierung der Antikörper, was zu den geringsten immunogenen Modifikationen aller Systeme führt. Die Antikörper werden direkt in das Kulturmedium sekretiert (Frenzel *et al.*, 2013). Der am häufigsten verwendete Zelltyp sind CHO-Zellen, hier wurden IgG mit einer Konzentration von 5 g/L produziert (Wurm, 2004). Durch Optimierung der Zellen und des Produktionsprozesses werden in der Industrie häufig Konzentration von 12 g/L erreicht (Frenzel *et al.*, 2013). Die am höchsten in der Literatur beschriebene Produktkonzentration wurde mit Per.C6-Zellen (humane embryonale Retinazellen) mit 27 g/L IgG erreicht (Jones *et al.*, 2008). Bei tierischen Zellen wird zwischen einer stabilen und transienten Produktion unterschieden. Bei der stabilen Produktion ist die Expressionskassette in das Zellgenom integriert. Die Herstellung solcher Zellen dauert jedoch zum Teil bis zu 12 Monaten (Lai *et al.*, 2013), wodurch transiente Produktion eine Alternative darstellt. Hierbei ist die Expressionskassette nicht stabil im Genom integriert, wodurch nur für eine Übergangszeit das Produkt hergestellt werden kann. Bei diesem System werden meist HEK 293-Zellen (*human embryonic kidney cells*) eingesetzt, da diese effizient mit Plasmid-DNA transformiert werden können. Erreichte Produktkonzentrationen sind für IgG bis zu 1,1 g/L (Backliwal *et al.*, 2008). Eher selten verwendete Produktionssysteme stellen transgene Tiere dar. Hierbei können die Antikörper unter anderem in die Milch des Tieres sekretiert werden (Yuskevich *et al.*, 2011). Auch transgene Pflanzen können für die Produktion von Antikörpern eingesetzt werden. Problematisch ist jedoch der die Aufarbeitung der Produkte, da diese aus dem Pflanzenmaterial extrahiert werden müssen (Daniell *et al.*, 2001).

1.8 Zielsetzung

Filamentöse Pilze besitzen große Kapazitäten für die Sekretion von Proteinen. Diese Eigenschaft soll in dieser Arbeit genutzt werden, um *N. crassa* für die Produktion heterologer Proteine zu nutzen. Als Modellproteine werden zwei verschiedene Antikörperfragmente in Form von scFv verwendet. Hierbei handelt es sich um den anti-Lysozym-scFv D1.3 (Verhoeyen *et al.*, 1988) und den anti-MUC1-scFv HT186-D11 (Thie *et al.*, 2011). Entscheidend ist dabei, dass das Produkt in das Kulturmedium sekretiert werden soll. Die Strategie der Sekretion beruht auf der Erzeugung eines Fusionsproteins bestehend aus einem *Carrier*-Protein und des entsprechenden scFv. Für eine optimale Genexpression wird eine Codon-optimierte Variante des scFv-Gens eingesetzt.

Die Arbeit ist in zwei grundlegend unterschiedliche Abschnitte geteilt. Im ersten Abschnitt sollen mit molekularbiologischen Techniken Produktionsstämme generiert werden, welche im Schüttelkolbenmaßstab das Fusionsprotein in das Kulturmedium sekretieren. Der wichtigste Schritt in diesem Abschnitt ist die Beseitigung der Proteaseaktivität im Kulturmedium, welche im schwerwiegendsten Fall sofort zum Abbau des sekretierten Produktes führen könnte. Dies soll durch die Verwendung von entsprechenden Deletionsmutanten erreicht werden, welche aus der *N. crassa*-Knock-Out-Bibliothek (Colot *et al.*, 2006) entnommen werden. Für die Optimierung der Genexpression werden verschiedene Promotoren untersucht. Die Sekretion soll durch die Verwendung bestimmter Mutanten, darunter auch morphologischen Mutanten optimiert werden. All diese Arbeiten werden am Institut für Genetik an der TU Braunschweig durchgeführt.

Nach der Generierung von Produktionsstämmen soll im zweiten Abschnitt ein Kultivierungsprozess etabliert und die Produktion optimiert werden. Dazu sollen verschiedene Medienzusammensetzungen und Prozessführungen in Bezug auf den pH-Wert verglichen werden. Hierfür wird ein paralleles Bioreaktorsystem genutzt. Nach der Optimierung des Prozesses soll das Produkt exemplarisch aus der Kulturbrühe isoliert und auf Aktivität überprüft werden. Im letzten Schritt soll der Kultivierungsmaßstab erhöht werden (Scale-Up) sowie ein Batch- mit einem Fed-Batch-Verfahren verglichen werden. Die Optimierung der Kultivierung wird in der Abteilung Pharmazeutische Biotechnologie des Fraunhofer ITEM durchgeführt.

Diese Arbeit beinhaltet daher die Generierung eines kompletten biotechnologischen Prozesses mit Stammgenerierung und Kultivierung und somit den Weg vom Gen zum Produkt.

2 Material und Methoden

2.1 Mikroorganismen: Stämme und Medien

2.1.1 *Neurospora crassa*

Tab. 2.1: Verwendete *Neurospora crassa*-Stämme. Mehrgliedrige Klonnummern weisen auf eine durchgeführte Einzelsporisolation hin.

| lfd. Nr. | Genotyp | Klon-Nr. | Vektor | Empfänger-stamm | Eltern-stämme | Ursprung |
|----------|---|----------|-------------------------|-----------------|----------------------|--------------|
| N1-01 | <i>mat A</i> | - | - | - | - | FGSC #2489 |
| N1-02 | <i>mat a</i> | - | - | - | - | FGSC #988 |
| N1-03 | <i>his-3</i> , <i>mat A</i> | - | - | - | - | FGSC #6103 |
| N1-04 | <i>his-3</i> , <i>mat a</i> | - | - | - | - | FGSC #9716 |
| N1-08 | $\Delta mus-51::bar^+$, <i>mat a</i> | - | - | - | - | FGSC #9718 |
| DHN-001 | $\Delta apr-3::hph$, <i>mat a</i> | - | - | - | - | FGSC #13284 |
| DHN-003 | $\Delta apr-7::hph$, <i>mat A</i> | - | - | - | - | FGSC #13334 |
| DHN-004 | $\Delta apr-13::hph$, <i>mat a</i> | - | - | - | - | FGSC #14728 |
| DHN-005 | $\Delta spr-5::hph$, <i>mat a</i> | - | - | - | - | FGSC #13553 |
| DHN-007 | $\Delta apr-9::hph$, <i>mat a</i> | - | - | - | - | FGSC #14776 |
| DHN-009 | $\Delta vib-1::hph$, <i>mat a</i> | - | - | - | - | FGSC #11308 |
| DHN-010 | $\Delta vib-1::hph$, <i>mat A</i> | - | - | - | - | FGSC #11309 |
| DHN-012 | $\Delta NCU00263::hph$, <i>mat A</i> | - | - | - | - | FGSC #11869 |
| DHN-013 | $\Delta mpr-1::hph$, <i>mat a</i> | - | - | - | - | FGSC #11847 |
| DHN-015 | $\Delta apr-10::hph$, <i>mat A</i> | - | - | - | - | FGSC #11951 |
| DHN-016 | $\Delta mpr-2::hph$, <i>mat a</i> | - | - | - | - | FGSC #12071 |
| DHN-017 | $\Delta spr-7::hph$, <i>mat A</i> | - | - | - | - | FGSC #12115 |
| DHN-018 | $\Delta spr-4::hph$, Heterokaryon | - | - | - | - | FGSC #12334 |
| DHN-020 | $\Delta NCU06720::hph$, <i>mat A</i> | - | - | - | - | FGSC #12323 |
| DHN-021 | $\Delta NCU09350::hph$, <i>mat A</i> | - | - | - | - | FGSC #16097 |
| DHN-022 | $\Delta NCU04903::hph$, <i>mat A</i> | - | - | - | - | FGSC #13518 |
| DHN-024 | $\Delta NCU05980::hph$, <i>mat A</i> | - | - | - | - | FGSC #13726 |
| DHN-025 | $\Delta NCU00831::hph$, <i>mat a</i> | - | - | - | - | FGSC #16399 |
| DHN-026 | $\Delta NCU04430::hph$, <i>mat A</i> | - | - | - | - | FGSC #16457 |
| DHN-027 | $\Delta apr-2::hph$, <i>mat a</i> | - | - | - | - | FGSC #16538 |
| DHN-028 | $\Delta apr-5::hph$, <i>mat a</i> | - | - | - | - | FGSC #14075 |
| DHN-030 | $\Delta apr-8::hph$, <i>mat A</i> | - | - | - | - | FGSC #14719 |
| DHN-032 | $\Delta apr-12::hph$, <i>mat A</i> | - | - | - | - | FGSC #14721 |
| DHN-033 | $\Delta NCU06834::hph$, <i>mat A</i> | - | - | - | - | FGSC #14847 |
| DHN-035 | $\Delta apr-1::hph$, <i>mat A</i> | - | - | - | - | FGSC #17477 |
| DHN-036 | $\Delta NCU09992::hph$, <i>mat A</i> | - | - | - | - | FGSC #18064 |
| DHN-037 | $\Delta spr-3::hph$, <i>mat a</i> , Heterokaryon | - | - | - | - | FGSC #20115 |
| DHN-039 | $\Delta apr-6::hph$, <i>mat A</i> | - | - | - | - | FGSC #18891 |
| DHN-049 | $\Delta spr-7::hph$, $\Delta apr-9::hph$, <i>mat a</i> | #13 | - | - | DHN-017 x DHN-007 | diese Arbeit |
| DHN-053 | $\Delta spr-7::hph$, $\Delta apr-9::hph$, <i>mat A</i> | #24 | - | - | DHN-017 x DHN-007 | diese Arbeit |
| DHN-054 | $\Delta NCU00263::hph$, $\Delta apr-3::hph$, <i>mat A</i> | #4 | - | - | DHN-012 x DHN-001 | diese Arbeit |
| DHN-057 | <i>gla-1::gla-1-d1.3-Tgla-hph</i> , $\Delta mus-51::bar^+$, <i>mat a</i> | #6.4.1 | Kassette aus DHP-005 | N1-08 | - | diese Arbeit |
| DHN-058 | <i>gla-1::gla-1-d1.3-Tgla-hph</i> , $\Delta mus-51::bar^+$, <i>mat a</i> | #9.3.2 | Kassette aus DHP-005 | N1-08 | - | diese Arbeit |

| lfd. Nr. | Genotyp | Klon-Nr. | Vektor | Empfänger-stamm | Eltern-stämme | Ursprung |
|----------|---|-----------|----------------------|-----------------|-------------------|--------------|
| DHN-059 | <i>gla-1::gla-1-d1.3-Tgla-hph, Δmus-51::bar⁺, mat a</i> | #13.4.1 | Kassette aus DHP-005 | N1-08 | - | diese Arbeit |
| DHN-060 | <i>gla-1::gla-1-d1.3-Tgla-hph, Δmus-51::bar⁺, mat a</i> | #14.2.1 | Kassette aus DHP-005 | N1-08 | - | diese Arbeit |
| DHN-061 | <i>gla-1::gla-1-d1.3-Tgla-hph, Δmus-51::bar⁺, mat a</i> | #17.1.1 | Kassette aus DHP-005 | N1-08 | - | diese Arbeit |
| DHN-062 | <i>gla-1::gla-1-ht186-d11-Tgla-hph, Δmus-51::bar⁺, mat a</i> | #1.1.1 | Kassette aus DHP-006 | N1-08 | - | diese Arbeit |
| DHN-063 | <i>gla-1::gla-1-ht186-d11-Tgla-hph, Δmus-51::bar⁺, mat a</i> | #13.1.1 | Kassette aus DHP-006 | N1-08 | - | diese Arbeit |
| DHN-064 | <i>gla-1::gla-1-ht186-d11-Tgla-hph, Δmus-51::bar⁺, mat a</i> | #15.1.1 | Kassette aus DHP-006 | N1-08 | - | diese Arbeit |
| DHN-065 | <i>gla-1::gla-1-ht186-d11-Tgla-hph, Δmus-51::bar⁺, mat a</i> | #22.1.1 | Kassette aus DHP-006 | N1-08 | - | diese Arbeit |
| DHN-070 | <i>Δvvd::hph, mat A</i> | - | - | - | - | FGSC #11556 |
| DHN-073 | <i>gla-1::gla-1-ht186-d11-Tgla-hph, Δvib-1::hph, Δmus-51::bar⁺, mat A</i> | #23 | - | - | DHN-063 x DHN-010 | diese Arbeit |
| DHN-074 | <i>gla-1::gla-1-ht186-d11-Tgla-hph, Δvib-1::hph, Δmus-51::bar⁺, mat A</i> | #24 | - | - | DHN-063 x DHN-010 | diese Arbeit |
| DHN-075 | <i>gla-1::gla-1-ht186-d11-Tgla-hph, Δvib-1::hph, mat A</i> | #14 | - | - | DHN-063 x DHN-010 | diese Arbeit |
| DHN-076 | <i>gla-1::gla-1-ht186-d11-Tgla-hph, Δvib-1::hph, mat A</i> | #15 | - | - | DHN-063 x DHN-010 | diese Arbeit |
| DHN-077 | <i>his-3⁺, Δvib-1::hph, mat a</i> | #1 | - | - | DHN-010 x N1-04 | diese Arbeit |
| DHN-082 | <i>exo-1, mat a</i> | - | - | - | - | FGSC #2256 |
| DHN-084 | <i>his-3⁺, Δvib-1::hph, Δvvd::hph, mat a</i> | - | - | - | DHN-070 x DHN-077 | diese Arbeit |
| DHN-107 | <i>Δgla-1::hph, mat A</i> | - | - | - | - | FGSC #7825 |
| DHN-117 | <i>his-3⁺::Pglglat-ht186-d11-13xmyc, Δvib-1::hph, mat a</i> | #1.11.1.1 | DHP-011 | DHN-077 | - | diese Arbeit |
| DHN-118 | <i>his-3⁺::Pvvd-glat-ht186-d11-13xmyc, Δvib-1::hph, mat a</i> | #3.4.1.1 | DHP-014 | DHN-077 | - | diese Arbeit |
| DHN-120 | <i>his-3⁺::Pccg-1-glat-ht186-d11-13xmyc, Δvib-1::hph, mat a</i> | #4.5.1.1 | DHP-016 | DHN-077 | - | diese Arbeit |
| DHN-129 | <i>his-3⁺::Pglglat-13xmyc, Δvib-1::hph, mat a</i> | #8.8.2.1 | DHP-013 | DHN-077 | - | diese Arbeit |
| DHN-137 | <i>his-3⁺, exo-1, mat a</i> | #95 | - | - | DHN-082 x N1-03 | diese Arbeit |
| DHN-138 | <i>gla-1::gla-1-ht186-d11-Tgla-hph, Δvib-1::hph, exo-1, mat A</i> | #8 | - | - | DHN-075 x DHN-082 | diese Arbeit |
| DHN-139 | <i>gla-1::gla-1-ht186-d11-Tgla-hph, Δvib-1::hph, exo-1, mat a</i> | #14 | - | - | DHN-075 x DHN-082 | diese Arbeit |
| DHN-140 | <i>gla-1::gla-1-ht186-d11-Tgla-hph, Δvib-1::hph, exo-1, mat a</i> | #21 | - | - | DHN-075 x DHN-082 | diese Arbeit |
| DHN-141 | <i>Δvib-1::hph, exo-1, mat a</i> | #3 | - | - | DHN-075 x DHN-082 | diese Arbeit |
| DHN-148 | <i>Δgla-1::hph, Δvib-1::hph, Δvvd::hph, mat A</i> | #36 | - | - | DHN-107 x DHN-084 | diese Arbeit |
| DHN-157 | <i>his-3⁺, Δvib-1::hph, Δvvd::hph, exo-1, mat a</i> | #4 | - | - | DHN-148 x DHN-137 | diese Arbeit |
| DHN-160 | <i>his-3⁺, Δvib-1::hph, Δvvd::hph, Δgla-1::hph, exo-1, mat a</i> | #96 | - | - | DHN-148 x DHN-137 | diese Arbeit |
| DHN-169 | <i>his-3⁺, Δvib-1::hph, Δvvd::hph, exo-1, mat a</i> | #1 | DHP-016 | DHN-157 | - | diese Arbeit |
| DHN-170 | <i>his-3⁺, Δvib-1::hph, Δvvd::hph, Δgla-1::hph, exo-1, mat a</i> | #1 | DHP-016 | DHN-160 | - | diese Arbeit |
| DHN-172 | <i>his-3⁺::Pccg-1-glat-ht186-d11-13xmyc, Δvib-1::hph, Δvvd::hph, exo-1, mat a</i> | #8.3.1 | DHP-016 | DHN-157 | - | diese Arbeit |
| DHN-176 | <i>his-3⁺::Pccg-1-glat-ht186-d11-13xmyc, Δvib-1::hph, Δvvd::hph, Δgla-1::hph, exo-1, mat a</i> | #14.1.1 | DHP-016 | DHN-160 | - | diese Arbeit |
| DHN-177 | <i>his-3⁺::Pglglat-ht186-d11-13xmyc, Δvib-1::hph, Δvvd::hph, exo-1, mat a</i> | #15.1.1 | DHP-011 | DHN-157 | - | diese Arbeit |
| DHN-178 | <i>his-3⁺::Pglglat-ht186-d11-13xmyc, Δvib-1::hph, Δvvd::hph, Δgla-1::hph, exo-1, mat a</i> | #17.1.2 | DHP-011 | DHN-160 | - | diese Arbeit |
| DHN-182 | <i>his-3⁺::Pvvd-glat-ht186-d11-13xmyc, Δvib-1::hph, Δvvd::hph, Δgla-1::hph, exo-1, mat a</i> | #9.2.3 | DHP-014 | DHN-160 | - | diese Arbeit |
| DHN-201 | <i>his-3⁺::Pvvd-glat-ht186-d11-13xmyc, Δvib-1::hph, Δvvd::hph, exo-1, mat a</i> | #23.1.1 | DHP-014 | DHN-157 | - | diese Arbeit |
| DHN-210 | <i>his-3⁺::Pccg-1-glat-htorig-13xmyc, Δvib-1::hph, Δvvd::hph, exo-1, mat a</i> | #5.2.2 | DHP-017 | DHN-157 | - | diese Arbeit |

| lfd. Nr. | Genotyp | Klon-Nr. | Vektor | Empfänger-stamm | Eltern-stämme | Ursprung |
|----------|--|----------|---------|-----------------|----------------------|--------------|
| DHN-211 | <i>his-3⁺::Pccg1nr-glat-htorig-13xmyc, Δvib-1::hph, Δvvd::hph, Δgla-1::hph, exo-1, mat a</i> | #2.1.1 | DHP-017 | DHN-160 | - | diese Arbeit |
| DHN-224 | <i>his-3⁺, Δapr-3::hph, exo-1, mat a</i> | #85 | - | - | DHN-054 x DHN-137 | diese Arbeit |
| DHN-228 | <i>Δapr-3::hph, Δapr-9::hph, Δspr-7::hph, ΔNCU00263::hph, mat A</i> | #67 | - | - | DHN-049 x DHN-054 | diese Arbeit |
| DHN-231 | <i>his-3⁺, Δapr-3::hph, Δapr-9::hph, Δspr-7::hph, ΔNCU00263::hph, exo-1, mat a</i> | #41 | - | - | DHN-228 x DHN-224 | diese Arbeit |
| DHN-250 | <i>his-3⁺::Pccg1nr-glat-ht186-d11-13xmyc, Δvib-1::hph, Δvvd::hph, exo-1, mat a</i> | #1.1.1 | DHP-020 | DHN-157 | - | diese Arbeit |
| DHN-252 | <i>his-3⁺::Pccg1nr-glat-ht186-d11-10xhis, Δvib-1::hph, Δvvd::hph, exo-1, mat a</i> | #7.5.1 | DHP-021 | DHN-157 | - | diese Arbeit |
| DHN-270 | <i>his-3⁺::Pccg1nr-glat-ht186-d11-10xhis, Δapr-3::hph, Δapr-9::hph, Δspr-7::hph, ΔNCU00263::hph, exo-1, mat a</i> | #4.1.1 | DHP-021 | DHN-231 | - | diese Arbeit |
| DHN-281 | <i>his-3⁺::Pccg1nr-glat-ht186-d11-13xmyc, Δapr-3::hph, Δapr-9::hph, Δspr-7::hph, ΔNCU00263::hph, exo-1, mat a</i> | #18.1.2 | DHP-020 | DHN-231 | - | diese Arbeit |

Tab. 2.2: Auflistung verwendeter *N. crassa*-Medien und Medienzusätze

| | | | | | |
|--------------------------------|------|------|-------|--|---------------------------|
| BDES-Agar | | | | | |
| Vogel's-Lösung (50x) | 2 | % | (v/v) | | |
| Agar | 15 | g/L | | | |
| BDES-Lösung (20x) | 5 | % | (v/v) | | Zugabe nach Autoklavieren |
| BDES-Lösung (20x) | | | | | |
| L-Sorbose | 200 | g/L | | | |
| Saccharose | 10 | g/L | | | |
| Fructose | 10 | g/L | | | |
| Biotin-Stocklösung, Bird | | | | | |
| Biotin | 61 | mg/L | | | |
| Biotin-Stocklösung, Vogel's | | | | | |
| Biotin | 50 | mg/L | | | |
| Bird Minimalmedium | | | | | |
| Bird-Lösung I (20x) | 5 | % | (v/v) | | Lösungen separat |
| Bird-Lösung II (20x) | 5 | % | (v/v) | | autoklavieren |
| Bird Minimalmedium, optimiert | | | | | |
| Bird-Lösung I, optimiert (20x) | 5 | % | (v/v) | | Lösungen separat |
| Bird-Lösung II (20x) | 5 | % | (v/v) | | autoklavieren |
| Bird-Lösung I (20x) | | | | | |
| deion. H ₂ O | 900 | g/L | | | |
| MES | 97 | g/L | | | |
| Dikaliumhydrogenphosphat | 34,8 | g/L | | | |
| Ammoniumchlorid | 26,8 | g/L | | | |
| Kaliumsulfat | 3,48 | g/L | | | |
| Natriumchlorid | 1,16 | g/L | | | |
| Spurenelementlösung Bird | 2 | mL | | | |
| Bird-Lösung I (20x), optimiert | | | | | |
| deion. H ₂ O | 900 | g/L | | | |
| MES | 97 | g/L | | | |
| Dikaliumhydrogenphosphat | 34,8 | g/L | | | |
| Ammoniumsulfat | 99,2 | g/L | | | |
| Kaliumsulfat | 3,48 | g/L | | | |
| Natriumchlorid | 1,16 | g/L | | | |
| Spurenelementlösung Bird | 2 | mL | | | |

| | | | | |
|--------------------------------------|------|-------|-------|-----------------------------|
| Bird-Lösung II (20x) | | | | |
| deion. H ₂ O | 760 | g/L | | |
| Magnesiumchlorid-Hexahydrat | 4,06 | g/L | | |
| Calciumchlorid-Dihydrat | 1,48 | g/L | | |
| Biotin-Stocklösung, Bird | 2 | mL | | |
| Molybdat-Stocklösung | 2 | mL | | |
| C-Quelle (meist Maltose) | 20 | g/L | | |
| Bottom Agar | | | | |
| Vogel's-Lösung (50x) | 2 | % | (v/v) | |
| Agar | 15 | g/L | | |
| FIGS-Lösung (10x) | 10 | % | (v/v) | Zugabe nach Autoklavieren |
| <i>exo-1-Δvib-1-Δgla-1</i> -Medium | | | | |
| Milchpulver (Lösung I) | 10 | g/L | | Lösungen I, II und III |
| Sorbose (Lösung II) | 20 | g/L | | separat autoklavieren, |
| Hefeextrakt (Lösung III) | 5 | g/L | | danach mischen und |
| Trypton (Lösung III) | 5 | g/L | | ausplattieren |
| Maltose (Lösung III) | 20 | g/L | | |
| (Histidin (Lösung III)) | 0,5 | g/L | | |
| <i>exo-1</i> -Medium | | | | |
| Vogel's-Lösung (50x) | 2 | % | (v/v) | |
| Stärke | 5 | g/L | | |
| Agar | 15 | g/L | | |
| L-Sorbose-Lösung (10x) | 10 | % | (v/v) | Zugabe nach Autoklavieren |
| FIGS-Lösung (10x) | | | | |
| L-Sorbose | 200 | g/L | | |
| Fructose | 5 | g/L | | |
| Glucose | 5 | g/L | | |
| Histidin-Lösung | | | | |
| L-Histidin-HCl-Monohydrat | 25 | mg/mL | | sterilfiltrieren |
| Komplexmedium | | | | |
| Hefeextrakt (Lösung I) | 10 | g/L | | Lösungen I und II separat |
| Trypton aus Casein (Lösung I) | 10 | g/L | | autoklavieren |
| Malzextrakt (Lösung I) | 5 | g/L | | |
| MES (Lösung II) | 4,9 | g/L | | |
| Maltose (Lösung II) | 17 | g/L | | |
| Komplexmedium, Feedinglösung | | | | |
| Hefeextrakt (Lösung I) | 100 | g/L | | Malzextrakt aufgrund |
| Trypton aus Casein (Lösung I) | 100 | g/L | | seiner geringen Löslichkeit |
| Malzextrakt (Lösung I) | 13 | g/L | | reduziert; Lösungen I und |
| MES (Lösung II) | 49 | g/L | | II separat autoklavieren |
| Maltose (Lösung II) | 191 | g/L | | |
| L-Sorbose-Lösung (10x) | | | | |
| L-Sorbose | 200 | g/L | | |
| Molybdat-Stocklösung | | | | |
| Natriummolybdat-Dihydrat | 483 | mg/L | | |
| Spurenelementelösung Vogel's | | | | |
| ddH ₂ O | 95 | mL | | |
| Zitronensäure-Monohydrat | 50 | g/L | | |
| Zinksulfat-Heptahydrat | 50 | g/L | | |
| Ammonium Eisen(II)-sulfat-Hexahydrat | 10 | g/L | | |
| Kupfersulfat-Pentahydrat | 2,5 | g/L | | |
| Mangansulfat-Monohydrat | 0,5 | g/L | | |
| Borsäure | 0,5 | g/L | | |
| Natriummolybdat-Monohydrat | 0,5 | g/L | | |
| Top Agar | | | | |
| Vogel's-Lösung (50x) | 2 | % | (v/v) | |
| Agar | 10 | g/L | | |
| FIGS-Lösung (10x) | 10 | % | (v/v) | Zugabe nach Autoklavieren |

| | | | | |
|-----------------------------------|-----|-----|-------|--|
| Vogel's Minimalmedium | | | | |
| Vogel's-Lösung (50x) | 2 | % | (v/v) | wenn andere C-Quelle: separat autoklavieren |
| Saccharose (oder andere C-Quelle) | 20 | g/L | | |
| (Agar) | 15 | g/L | | |
| Vogel's-Lösung (50x) | | | | |
| ddH ₂ O | 755 | mL | | |
| Natriumcitrat-Dihydrat | 125 | g/L | | |
| Kaliumdihydrogenphosphat | 250 | g/L | | |
| Ammoniumnitrat | 100 | g/L | | |
| Magnesiumsulfat-Heptahydrat | 10 | g/L | | |
| Calciumchlorid-Dihydrat | 5 | g/L | | separat in 20 mL lösen |
| Spurenelementelösung Vogel's | 5 | mL | | |
| Biotin-Stocklösung | 2,5 | mL | | |
| Westergaard's Medium | | | | |
| Westergaard's Lösung (2x) | 50 | % | (v/v) | |
| Saccharose | 15 | g/L | | |
| Agar | 15 | g/L | | |
| Westergaard's Lösung (2x) | | | | |
| Kaliumnitrat | 2,0 | g/L | | |
| Dikaliumhydrogenphosphat | 1,4 | g/L | | |
| Kaliumdihydrogenphosphat | 1,0 | g/L | | |
| Magnesiumsulfat-Heptahydrat | 1,0 | g/L | | |
| Natriumchlorid | 0,2 | g/L | | |
| Calciumchlorid-Dihydrat | 0,2 | g/L | | |
| Biotin-Stocklösung | 0,1 | mL | | |
| Spurenelementelösung Vogel's | 0,2 | mL | | |

2.1.2 *Escherichia coli*

Tab. 2.3: Verwendeter *E. coli*-Stamm für Klonierungen und Produktion

| Bezeichnung | Genotyp | Ursprung |
|---------------------------|---|------------|
| XL1-Blue MRF ⁺ | $\Delta(mcrA)183, \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, subE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac$ | Stratagene |

Tab. 2.4: Auflistung verwendeter *E. coli*-Medien

| | | |
|-------------|----|-----|
| LB-Medium | | |
| Hefeextrakt | 5 | g/L |
| Trypton | 10 | g/L |
| NaCl | 5 | g/L |
| (Agar) | 15 | g/L |
| 2xYT-Medium | | |
| Hefeextrakt | 10 | g/L |
| Trypton | 16 | g/L |
| NaCl | 5 | g/L |

Tab. 2.5: Auflistung verwendeter Medienzusätze

| Bezeichnung | Stammlösung | Endkonzentration |
|-------------|-------------|------------------|
| Ampicillin | 100 mg/mL | 100 µg/mL |
| IPTG | 0,2 M | 50 µM |
| Glucose | 2,0 M | 100 mM |
| Saccharose | 2,0 M | 50 mM |

2.1.3 *Saccharomyces cerevisiae*

Tab. 2.6: Für das *Yeast Recombinational Cloning* eingesetzter *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm

| Bezeichnung | Genotyp | Ursprung |
|-------------|--|------------|
| FY834 | <i>his3Δ200, ura3-52, leu2Δ1, lsy2Δ202, trp1Δ62, mat α</i> | FGSC #9721 |

Tab. 2.7: Auflistung verwendeter Hefe-Medien

| | | |
|-----------------------------|----------|-----------------------|
| YPD | | |
| Hefeextrakt | 10 g/L | |
| Pepton aus Fleisch | 20 g/L | |
| Glucose | 20 g/L | |
| Adenin | 0,1 g/L | |
| Uracil | 0,2 g/L | |
| (Agar) | 15 g/L | |
| SC -ura | | |
| „Drop out base“ mit Glucose | 26,7 g/L | auf pH 6,5 einstellen |
| „Drop out mix“ ohne Uracil | 2 g/L | |
| Agar | 15 g/L | |

2.2 Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von kommerziellen Anbietern bezogen und werden daher nicht separat aufgeführt. Einige Reagenzien sowie Größenstandards und Kits sind in Tab. 2.8 aufgeführt.

Tab. 2.8: Verwendete Chemikalien und Kits

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|---------------|
| 3,5-Dinitrosalicylsäure | Sigma-Aldrich |
| 4-Iodophenylborsäure (IPBA) | Sigma-Aldrich |
| 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat - p-Toluidinsalz (BCIP) | Applchem |
| Ammoniak Test-Kit | R-Biopharm |
| Azocasein | Sigma-Aldrich |
| Carrier-DNA | |
| Salmon Sperm DNA | Invitrogen |

| Bezeichnung | Hersteller |
|---|----------------------|
| Chelating Fast Flow Sepharose | GE Healthcare |
| cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets | Roche |
| DNA-Marker | |
| GeneRuler 1 kb DNA Ladder | Thermo Scientific |
| DNA-Reinigungskits | |
| Hi Yield Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kits | Süd-Laborbedarf GmbH |
| Hi Yield Plasmid Mini DNA Isolierungskit | Süd-Laborbedarf GmbH |
| dNTPs | Thermo Scientific |
| Enzympuffer | |
| 10x FastDigest Green Buffer | Thermo Scientific |
| Enzym-spezifische Puffer | Thermo Scientific |
| Hygromycin | Invitrogen |
| Imidazol | Carl Roth |
| Luminol | Sigma-Aldrich |
| MUC1, 32mer (Muzin, Tumormarker) | HZI BS, AG Frank |
| Natrium-Kaliumtartrat | Sigma-Aldrich |
| Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) | Applichem |
| o-Dianisidin | Sigma-Aldrich |
| o-Phenyldiamindihydrochlorid (OPD) | Sigma-Aldrich |
| Proteinmarker | |
| PageRuler Prestained Protein Ladder | Thermo Scientific |
| PageRuler Unstained Protein Ladder | Thermo Scientific |
| RotiQuant 5x | Carl Roth |

2.3 Puffer und Lösungen

Tab. 2.9: Auflistung verwendeter Puffer und Lösungen

| | | | | |
|---|---------|----|-------|---------------------|
| Acrylamidmix | | | | |
| Acrylamid | 30 | % | (w/v) | |
| Bisacrylamid | 0,8 | % | (w/v) | |
| Agarosegel | | | | |
| Agarose | 0,7-0,8 | % | (w/v) | in TAE-Puffer |
| Ammoniumperoxidsulfat (APS)-Lösung | | | | |
| APS | 10 | % | (w/v) | |
| BCIP-Lösung | 1,5 | % | (w/v) | in 100 % DMF |
| Bindepuffer IMAC | | | | |
| Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O | 20 | mM | | |
| NaCl | 500 | mM | | |
| Imidazol | 10 | mM | | |
| Coomassie-Färbelösung | | | | |
| Coomassie Brilliant Blue G 250 | 70 | µM | | Zugabe von HCl nach |
| HCl, konz. | 0,3 | % | (v/v) | 3 h Rühren |
| DNA-Extraktionspuffer <i>N. crassa</i> | | | | |
| Tris-HCl, pH 7,5 | 50 | mM | | |
| EDTA, pH 7,5 | 50 | mM | | |
| SDS | 3 | % | (w/v) | |
| β-Mercaptoethanol | 1 | % | (v/v) | |
| DNA-Ladepuffer | | | | |
| Orange G | 0,5 | % | (w/v) | |
| Xylencyanol FF | 0,25 | % | (w/v) | |
| Ficoll 400 | 15 | % | (w/v) | |
| EDTA | 10 | mM | | |

| | | | | | |
|---|-------|------|-------|--|--|
| ECL-Lösung I | | | | | |
| Luminol | 25 | mM | | | lichtdichte Lagerung |
| IPBA | 4 | mM | | | |
| Tris, pH 8,0 | 200 | mM | | | |
| ECL-Lösung II | | | | | pH auf 4,0 mit Phosphorsäure eingestellt |
| H ₂ O ₂ (30%) | 0,108 | % | (v/v) | | |
| Na ₃ PO ₄ × 10 H ₂ O | 0,025 | % | (w/v) | | |
| ELISA Substratmix | | | | | |
| OPD | 0,04 | % | (w/v) | | in Substratpuffer, frisch ansetzen |
| H ₂ O ₂ | 0,02 | % | (v/v) | | |
| ELISA Substratpuffer | | | | | |
| Tri-Natriumcitrat-Dihydrat | 100 | mM | | | auf pH 5,0 einstellen mit HCl |
| Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat | 230 | mM | | | |
| ELISA-Block-Puffer | | | | | |
| Milchpulver | 2 | % | (w/v) | | in 0,1 % PBS-T |
| ELISA-Wasch-Puffer | | | | | |
| Tween20 | 0,05 | % | (v/v) | | in PBS |
| Elutionspuffer IMAC | | | | | |
| EDTA | 100 | mM | | | in PBS |
| Ethidiumbromid-Lösung | | | | | |
| Ethidiumbromid | 0,5 | % | (w/v) | | |
| Färbelösung Maltosenachweis | | | | | |
| 3,5-Dinitrodalicylsäure | 96 | mM | | | |
| Natrium-Kaliumtartrat-Tetrahydrat | 106 | mM | | | |
| NaOH | 400 | mM | | | |
| Färbereagens I Glucose | | | | | |
| o-Dianisidin | 0,25 | % | (w/v) | | in 95 % Ethanol |
| Färbereagens II Glucose | | | | | |
| Glucoseoxidase | 117 | mg/L | | | in Sörensenpuffer |
| Peroxidase | 33 | mg/L | | | |
| Laemmli-Puffer (5x) | | | | | |
| SDS | 10 | % | (w/v) | | |
| Glycerin | 50 | % | (v/v) | | |
| Bromphenolblau | 0,02 | % | (w/v) | | |
| β-Mercaptoethanol | 15 | % | (v/v) | | |
| Lugol'sche Lösung | | | | | |
| KI | 2 | % | (w/v) | | |
| I ₂ | 1 | % | (w/v) | | |
| MPBS-T | | | | | |
| Milchpulver | 2 | % | (w/v) | | in PBS-T |
| NBT | 3 | % | (w/v) | | in 70 % DMF |
| PBS | | | | | |
| NaCl | 0,8 | % | (w/v) | | |
| KCl | 0,02 | % | (w/v) | | |
| Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O | 0,144 | % | (w/v) | | |
| KH ₂ HPO ₄ | 0,024 | % | (w/v) | | |
| PBS-T | | | | | |
| Tween20 | 0,1 | % | (v/v) | | in PBS |
| PE-Puffer | | | | | |
| Tris | 50 | mM | | | |
| EDTA | 1 | mM | | | |
| Saccharose | 20 | % | (w/v) | | |
| Phosphatpuffer | | | | | |
| Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O | 20 | mM | | | |
| NaCl | 6,7 | mM | | | |
| Plasmid-Isolutionslösung I | | | | | |
| Glucose | 50 | mM | | | |
| Tris, pH 8,0 | 25 | mM | | | |
| EDTA | 10 | mM | | | |

| | | | | |
|---|-------|-------|---------|-----------------------|
| Plasmid-Isolutionslösung II | | | | |
| NaOH | 0,2 | M | | |
| SDS | 1 | % | (w/v) | |
| Plasmid-Isolutionslösung III | | | | |
| Kaliumacetat | 3 | M | | |
| Essigsäure | 11,5 | % | (v/v) | |
| Proteinextraktionspuffer | | | | |
| HEPES, pH 7,5 | 50 | mM | | |
| EDTA, pH 8,0 | 5 | mM | | |
| EGTA | 2 | mM | | |
| NaCl | 100 | mM | | |
| Triton X100 | 1 | % | (v/v) | |
| Glycerin | 10 | % | (v/v) | |
| Natriumorthovanadat | 1 | mM | | |
| Natriumfluorid | 10 | mM | | |
| Roche cOmplete (Protease-Inhibitor) | 1 | Tab. | à 20 mL | |
| Regenerierlösung IMAC | | | | |
| NaCl | 500 | mM | | auf pH 7,4 einstellen |
| EDTA | 200 | mM | | mit NaOH |
| Sammelgel-Puffer für SDS-Gel | | | | |
| Tris-HCl (pH 6,8) | 1,0 | M | | |
| SDS-PAGE-Lauf-Puffer | | | | |
| Tris | 25 | mM | | |
| Glycin | 192 | mM | | |
| SDS | 0,1 | % | (w/v) | |
| Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung | | | | |
| SDS | 10 | % | (w/v) | |
| Sörensenpuffer | | | | |
| KH ₂ PO ₄ | 40 | mM | | auf pH 7,0 einstellen |
| Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O | 35 | mM | | mit NaOH/HCl |
| Substratpuffer für Immunoblot (AP) | | | | |
| Tris HCl | 100 | mM | | pH 9,5 |
| MgCl ₂ | 0,5 | mM | | |
| TAE-Puffer | | | | |
| Tris-HCl | 4 | mM | | |
| Essigsäure | 2 | mM | | |
| EDTA (pH 8,0) | 1 | mM | | |
| TE-Puffer mit RNase | | | | |
| Tris-HCl, pH 8,0 | 10 | mM | | |
| EDTA | 0,1 | mM | | |
| RNase | 200 | µg/mL | | |
| Transferpuffer für Western Blot | | | | |
| Tris | 25 | mM | | |
| Glycin | 192 | mM | | |
| Methanol | 20 | % | (v/v) | |
| Trenngel-Puffer für SDS-PAGE | | | | |
| Tris | 1,5 | M | | |
| Waschpuffer IMAC | | | | |
| Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O | 20 | mM | | |
| NaCl | 500 | mM | | |
| Imidazol | 20/30 | mM | | |

2.4 Enzyme

Tab. 2.10: Auflistung aller verwendeten Enzyme

| Typ | Bezeichnung | Hersteller |
|-------------------|-----------------------------|-------------------|
| Ligase | T4 DNA-Ligase | Thermo Scientific |
| Oxidase | Glucoseoxidase Typ II | Sigma-Aldrich |
| Peroxidase | Peroxidase Typ II | Sigma-Aldrich |
| Restriktionsenzym | <i>NotI</i> | Thermo Scientific |
| Restriktionsenzym | <i>BcuI</i> (<i>SpeI</i>) | Thermo Scientific |
| Restriktionsenzym | <i>XbaI</i> | Thermo Scientific |
| Restriktionsenzym | <i>PacI</i> | Thermo Scientific |
| Restriktionsenzym | <i>SgsI</i> (<i>AscI</i>) | Thermo Scientific |
| Restriktionsenzym | <i>KpnI</i> | Thermo Scientific |
| Restriktionsenzym | <i>MunI</i> (<i>MfeI</i>) | Thermo Scientific |
| Restriktionsenzym | <i>EcoRI</i> | Thermo Scientific |
| Restriktionsenzym | <i>PstI</i> | Thermo Scientific |
| RNase | RNase A | Thermo Scientific |
| Taq -Polymerase | Phusion DNA-Polymerase | Thermo Scientific |
| Taq-Polymerase | DreamTaq DNA-Polymerase | Thermo Scientific |

2.5 Antikörper

Tab. 2.11: Eingesetzte Antikörper für Immunostain und ELISA

| Bezeichnung | Antigen | Hersteller | Verdünnung |
|--|----------------|-------------------|------------|
| 6x-His Epitope Tag Antibody (HIS.H8) | <i>his-tag</i> | Thermo Scientific | 1:2.000 |
| Anti-Mouse IgG (Fc specific)–Alkaline Phosphatase antibody produced in goat | Mouse IgG, Fc | Sigma-Aldrich | 1:200.000 |
| Anti-Mouse IgG (Fc specific)–Peroxidase antibody produced in goat | Mouse IgG, Fc | Sigma-Aldrich | 1:80.000 |
| F(ab') ₂ -Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP conjugate | Mouse IgG, | Life Technologies | 1:4.000 |
| Monoclonal Anti-c-Myc antibody produced in mouse, clone 9E10 | <i>myc-tag</i> | Sigma-Aldrich | 1:5.000 |

2.6 Plasmide

Tab. 2.12: In dieser Arbeit verwendete und erzeugte Plasmide

| lfd. Nr. | Plasmid | Vektor | Insert | Beschreibung | Herkunft |
|----------|------------------------------------|--------|----------------------------|---|-------------------|
| DHP-001 | pOPE101-ht186-d11 | - | - | Expressionsvektor für <i>E. coli</i> | AG Dübel |
| DHP-002 | pOPE101-d1.3 | - | - | Expressionsvektor für <i>E. coli</i> | AG Dübel |
| DHP-003 | pOPE101-tob5-d4 | - | - | Expressionsvektor für <i>E. coli</i> | AG Dübel |
| DHP-004 | pOPE101-sh511-b1 | - | - | Expressionsvektor für <i>E. coli</i> | AG Dübel |
| DHP-005 | pRS426-knockin-gla1-d1.3-Tgla-hph | pRS426 | gla5'-d1.3-Tgla-hph-gla3' | zusammengesetzte Integrationskassette nach YRC, Integration <i>gla-1</i> -Locus | diese Arbeit |
| DHP-006 | pRS426-knockin-gla1-ht186-Tgla-hph | pRS426 | gla5'-ht186-Tgla-hph-gla3' | zusammengesetzte Integrationskassette nach YRC, Integration <i>gla-1</i> -Locus | diese Arbeit |
| DHP-007 | pRS426-Pgla-gla1-d1.3-Tgla | pRS426 | Pgla-gla1-d1.3-Tgla | zusammengesetzte Integrationskassette nach YRC | diese Arbeit |
| DHP-009 | pBM61-Pgla-gla1-d1.3-Tgla | pBM61 | Pgla-gla1-d1.3-Tgla | Integration am <i>his-3</i> -Locus | diese Arbeit |
| DHP-011 | pDH01-glat-ht186 | pMF276 | Pgla-glat-ht186-13xmyc | Integration am <i>his-3</i> -Locus | diese Arbeit |
| DHP-013 | pDH01-glat | pMF276 | Pgla-glat-13xmyc | Integration am <i>his-3</i> -Locus | diese Arbeit |
| DHP-014 | pDH02-glat-ht186 | pMF276 | Pvvd-glat-ht186-13xmyc | Integration am <i>his-3</i> -Locus | diese Arbeit |
| DHP-016 | pDH04-glat-ht186 | pMF276 | Pccg-1-glat-ht186-13xmyc | Integration am <i>his-3</i> -Locus | diese Arbeit |
| DHP-017 | pDH05-glat-ht186orig | pMF276 | Pccg-1-glat-htorig-13xmyc | Integration am <i>his-3</i> -Locus | diese Arbeit |
| DHP-020 | pDH07-glat-ht186 | pMF276 | Pccg1nr-glat-ht186-13xmyc | Integration am <i>his-3</i> -Locus | diese Arbeit |
| DHP-021 | pDH08-glat-ht186 | pMF276 | Pccg1nr-glat-ht186-10xhis | Integration am <i>his-3</i> -Locus | diese Arbeit |
| - | pMA-T-HT186 | - | - | enthält Codon-optimiertes ht186-Gen | Life Technologies |
| - | pMA-T-D1.3 | - | - | enthält Codon-optimiertes d1.3-Gen | Life Technologies |
| - | pCSN44 | - | - | enthält hph-Kassette | FGSC |
| - | pRS426 | - | - | Ausgangsvektor für YRC | FGSC |
| - | pMF272 | - | - | Ausgangsvektor | FGSC |
| - | pMF276 | - | - | Ausgangsvektor mit Integration am <i>his-3</i> -Locus und 13xmyc | FGSC |
| - | pBM61 | - | - | Ausgangsvektor mit Integration am <i>his-3</i> -Locus | FGSC |

2.7 Primer

Tab. 2.13: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

| lfd. Nr. | Bezeichnung | Sequenz |
|----------|----------------------|--|
| 12 | bem1_center_for | AAGAATGGAGCCATGGTTTATGGT |
| 13 | bem1_center_rev | TTCAAGAGGGAACCTCGGTTAGGA |
| 21 | his3-f | CTTGCACTCTGCACGTTG |
| 22 | his3-r | CTCTCGAGTCCCGTTATTGC |
| 82 | HPH F | GTCGGAGACAGAAGATGATATTGAAGGAGC |
| 83 | HPH R | GTTGGAGATTTTCAGTAACGTTAAGTGGAT |
| 317 | hph-test-r | TCGTCCGAGGGCAAAGGAATAGAG |
| 684 | gla5'-NotI-Yeast-for | GTAACGCCAGGGTTTTCAGTCACGACGGCGGCCGCTCCACA ACTTCGACCCCGCTG |
| 685 | gla5'-rev | CCTCCACGTATCATCAAGAGTCG |
| 686 | D1-3-Linker_gla-for | CTCTTGATGATACGTGGAGGGGCGGCGGCTCCGGCGGCGG CGGCTCCGGCGGCGGCGGCTCCGAAGTCAAGTTGCAAGAATC |

| lfd. Nr. | Bezeichnung | Sequenz |
|----------|--------------------------|---|
| 687 | D1-3-Term_gla-rev | CCTAGTACGAAGCAAGCGATTTCAGTGGTGATGATGATGATGGG ACAAAATC |
| 688 | HT186-D11-Linker_gla-for | CTCTTGATGATACGTGGAGGGGCGGCGGGCTCCGGCGGGCGG CGGCTCCGGCGGGCGGGCTCCCAGATGCAGCTCGTCCAGTC |
| 689 | HT186-D11-Term_gla-rev | CCTAGTACGAAGCAAGCGATTTCAGTGGTGATGGTGGTGGTGGG AGAGGTC |
| 690 | Tgla-for | ATCGCTTGCTTCGTACTAGG |
| 691 | Tgla-hph-rev | ATATCATCTTCTGTCTCCGACCAAGCATATATACCACGG |
| 692 | gla3'-hph-for | ACGTTACTGAAATCTCCAACGTCAAAACAAAACCTAAAA |
| 694 | Pgla5'-NotI-Yeast-for | GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGGCGGCCGCCACTC ATTTCTTCACCAT |
| 707 | Tgla-SpeI-Yeast-neu-rev | GCGGATAACAATTTTCACACAGGAAACAGCACTAGTCAAGCATA TATACCACGGCA |
| 708 | gla3'-NotI-Yeast-neu-rev | GCGGATAACAATTTTCACACAGGAAACAGCGCGGCCGCAGGGCG CCGAGCAGAAGGAG |
| 727 | vib1-test F | CTCTGATGGCCTGGGTTATTT |
| 731 | pRS426-seq-f | TTCAGGCTGCGCAACTGTTG |
| 732 | gla5'-seq-f | CCAGCACCACCGTCACCCCT |
| 733 | HT186-seq-f | TCGGCTCCAAGTCCGTCCAC |
| 734 | D1.3-seq-f | AACAAAAGCAAGGTAAATCC |
| 735 | Tgla-seq-f | GCTTCTCAACAAAATTTCAA |
| 736 | hph1-seq-f | ATGCAGCTCTCGGAGGGCGA |
| 737 | hph2-seq-f | GCCGATAGTGGAACCGACG |
| 738 | gla3'-seq-f | TCTTGAGACCCTCGTAGAGG |
| 739 | Pgla-seq-f | GACCAGGGTTCACCAGCCGG |
| 740 | gla-seq-f | CTGGCTTCGATCTCTGGGAG |
| 741 | spr-7-test-f | ATCAGTTTTGTAGGCGTGCC |
| 742 | apr-9-test-f | AGTAGTTTTGGTGTTAGGCGT |
| 743 | apr-3-test-f | AGGGGGACGACTTTGGGGAG |
| 744 | NCU00263-test-f | CATTTAGTGGCTTTGGACGG |
| 745 | Pvvd-NotI-f | ACTACTGCGGCCGCGCAGTGGCATCAAACACAAGC |
| 745 | Pvvd-NotI-f | ACTACTGCGGCCGCGCAGTGGCATCAAACACAAGC |
| 755 | gla5-neu-seq | GCTCTGGTCCACCACTATTG |
| 756 | gla3-test-r | TTCCCAGATCTTCCAGATGC |
| 767 | Pgla-test-f | CCACTCATTTCTTTCAC |
| 768 | Pgla2-seq-f | TTTCATGGTCGACCTCCAG |
| 776 | gla5-extra-seq-f | GTCCGCCAACTCTCTGCCC |
| 794 | glat-XbaI-HT186-r | ACTGGACGAGCTGCATCTGTCTAGAGCCGGTCTGCGTGGGA GGGGTGAC |
| 795 | HT186-XbaI-f | AGACCGGCTCTAGACAGATGCAGCTCGTCCAGTCCGAGG |
| 796 | HT186-PacI-Yeast-r | GCGGATAACAATTTTCACACAGGAAACAGCGTTAATTAAGGA GGACGGGAAGAGGGTGACG |
| 797 | Pvvd-NotI-Yeast-f | GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGGCGGCCGCGCAG TGGCATCAAACACAAGCCG |
| 798 | Pvvd-AscI-glat-r | AGCGAAGAGACGAGATGCATGGCGCGCCGGTGCTGGTTATG AGACAGTG |
| 799 | glat-AscI-Pvvd-f | AGCACCGGCGCGCCATGCATCTCGTCTCTTCGCTCC |
| 802 | glat-PacI-r | AGTAGTGTTAATTAAGCCGGTCTGCGTGGGAGGGGTGACGG TGGTGC |

| lfd. Nr. | Bezeichnung | Sequenz |
|----------|--------------------|--|
| 803 | HT186-test-f | AAGAAGCCTGGCGCCTCCG |
| 804 | HT186-test-r | TTGGGCTGGCCGAGGACGG |
| 808 | vvd-test-f | AACCTATACGGTGCAAGTTGTCG |
| 809 | Pgl3-seq-f | TCAAGACCGTCCTCTCGG |
| 810 | Pvvd1-seq-f | TATCCTGCTGGTGATCATCCC |
| 811 | Pvvd2-seq-f | TTAAGGTGTCAAGTGTCG |
| 812 | Pvvd3-seq-f | AAGTGTGAAGCATATATGGC |
| 813 | Pvvd4-seq-f | TCTCCATACAGGACCCTGGG |
| 814 | gl175-seq-f | TTCTGTGCAACATCGGTGC |
| 831 | Pccg1-NotI-f | ACTACTGCGGCCGCTAGAAGGAGCAGTCCATCTGC |
| 832 | Pccg1-AscI-r | TGATGAGGCGCGCCGATTTGGTTGATGTGAGGGG |
| 833 | pMF276-test-r | TGCAGCCCGGGGGATC |
| 863 | gl1-test-f | TTCCATCTACAGCGCGAGGG |
| 909 | HT186_orig-XbaI-f | ACTACTTCTAGACAGATGCAGCTGGTACAGTCTGAGGC |
| 910 | HT186_orig-PacI-r | AGTAGTTTAAATTAAGACGACGGGAACAGAGTGACCG |
| 920 | Yeast-NotI-pccg1-f | GTAACGCCAGGGTTTTTCCCAGTCACGACGGCGGCCGCTAGA AGGAGCCCTCTCCC |
| 921 | pccg1-credel-r | AAGTGAGGCAATCTTCGTCTTACCCGTTGTCTGCCCCCTT TGAACCCCTCTCCC |
| 923 | pccg1-nrsdel-f | AAGGACGAAGATTGCCTCACTTCTTTTGCTGCAAAGAAGG CGC |
| 925 | pccg1-AscI-Yeast-r | GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCGGCGCGCCGATT TGGTTGATGTGAGGGG |
| 928 | HTorig-seq | AAAGACGGCCAGGATTACC |

2.8 Verbrauchsmaterial

Tab. 2.14: Verwendete Verbrauchsmaterialien

| Bezeichnung | Hersteller |
|---|-------------------|
| Dialyse-Schlauch | |
| <i>VISKING</i> , Wanddicke: 0,023 mm, Durchmesser 21,5 mm | Carl Roth |
| Elektroporationsküvetten | Carl Roth |
| Filter | |
| Filter Discs Grade 389, Dia.: 55mm | Sartorius |
| Spritzenvorsatzfilter 0,2 µm | Sartorius |
| Miracloth | Calbiochem |
| Mullkompresse | Gazin |
| Nunc Sealing Tapes | Thermo Scientific |
| Nunc-Immunoplates MaxiSorp 96-Well | Thermo Scientific |
| Western Blot | |
| Immobilon-P, PVDF, 0,45 µm (Membran) | Millipore |
| GBX developer/replenisher (Entwicklerlösung) | Carestream Kodak |
| GBX fixer/replenisher (Fixierlösung) | Carestream Kodak |
| Hyperfilm ECL (Röntgenfilm) | Amersham |

2.9 Geräte und technische Anlagen

Tab. 2.15: Eingesetzte Geräte und technische Anlagen

| Bezeichnung | Modell | Hersteller |
|---------------------------|------------------------------|-----------------------|
| 10 L-Bioreaktor | s. Tab. 2.22 | B. Braun Biotech |
| HPLC | ÄKTAexplorer 10 | GE Healthcare |
| Elektroporator | Pulse Controller II | Bio-Rad |
| ELISA-Reader | SpectraMax 190 | Molecular Devices |
| Geldokumentation | Geldoc XR | Bio-Rad |
| Gelelektrophoresekammern | | |
| DNA | Mini/Midi | G&P Kunststofftechnik |
| Proteine | Mini-PROTEAN Tetra System | Bio-Rad |
| Heizblock | AccuBlock | Labnet |
| | Thermomixer comfort | Eppendorf |
| Heizofen | UNB 100 | Memmert |
| Homogenisator | Precellys 24 | Bertin Technologies |
| Inkubationsschüttler | Multitron | Infors |
| Mikroskope | Axioskop AX10 | Zeiss |
| Milli-Q-Anlage | Super-Q Water System | Millipore |
| parallel Bioreaktorsystem | s. Tab. 2.21 | DASGIP GmbH |
| Photometer | Novaspec II | Amersham Biosciences |
| | Ultraspec 2000 | Pharmacia Biotech |
| Stereolupe | | |
| Sterilbank | HERAsafe HS18 | Heraeus Instruments |
| | HLB 2472 | Heraeus Instruments |
| Thermocycler | Mastercycler | Eppendorf |
| Überkopfschüttler | LD-79 | Labor Brand |
| Vortex | Vortex Genie 2 | Scientific Industries |
| Waagen | Extend | Sartorius |
| | ED8201-cw | Sartorius |
| | ED3202S-cw | Sartorius |
| | TE124S-OCE | Sartorius |
| Wasserbad | - | GFL |
| Wippe | Polymax 1040 | Heidolph |
| | Celloshaker variospeed | Chemetron |
| | Rocker 25 | Labnet |
| Zentrifuge | Megafuge 1.0 R | Heraeus Instruments |
| | CPKR centrifuge | Beckmann |
| | Heraeus Fresco 21 centrifuge | Thermo Scientific |
| | Sorvall RC 3B | Du Pont Instruments |
| | Sorvall RC-5b | Du Pont Instruments |
| | Biofuge 22R | Heraeus Sepatech |
| | Heraeus Pico 17 | Thermo Scientific |

2.10 Software und Datenbanken

Tab. 2.16: Verwendete Software und Online-Datenbanken

| Bezeichnung | Hersteller | Verwendung |
|-----------------------------------|--|---|
| UBICON | ESD Electronic System Design | Steuerung der 10 L-Bioreaktoren |
| DASGIP Control 4 | DASGIP GmbH | Steuerung des parallelen Bioreaktorsystems |
| ExPASy | http://www.expasy.org/ | Bioinformatische Tools |
| FGSC | Fungal Genetic Stock Center http://www.fgsc.net/ | Methoden- und Stammsammlung |
| Finch TV 1.4.0 | Geospiza | Darstellung von Sequenzierdaten |
| ImageJ | Wayne Rasband http://rsbweb.nih.gov/ij/ | Auswertung von Bilddateien |
| MultAlin Interface | http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin | Sequenzvergleiche |
| NCBI | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ | Literatur, Protein- und Gensequenzen, |
| <i>Neurospora crassa</i> Database | Broad Institute http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/neurospora/ | <i>N. crassa</i> Gendatenbank |
| Quantity One | Bio-Rad | Dokumentation von Agarose- und Polyacrylamidgelen |
| SeqBuilder | DNASTAR | Vektoren-Verwaltung |
| SigmaPlot | Systat Software | Erstellung von Diagrammen |
| SoftMax Pro | Molecular Devices | Steuerung von ELISA-Reader |
| Unicorn | GE Healthcare | Steuerung der HPLC-Anlage |

2.11 Molekularbiologische Methoden

2.11.1 DNA-Isolierung

2.11.1.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolation von Plasmid-DNA erfolgte aus *E. coli*-Kulturen, welche über Nacht bei 37 °C in LB-Medium inkubiert wurden. Je 1,5 mL der jeweiligen Kultur wurden in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß transferiert und bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert (30 sek, $17.000 \times g$, RT). Der Überstand wurde komplett mit einer Pipette entfernt, das Zellpellet in 100 µl Lösung I (vorgekühlt) resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. 200 µl der Lösung II wurden hinzugeben und durch mehrmaliges Invertieren des Gefäßes gemischt mit anschließender Inkubation für 5 min bei RT. 150 µl von Lösung III (vorgekühlt) wurden hinzugegeben, durch mehrmaliges Invertieren vorsichtig gemischt und erneut für 5 min bei RT inkubiert. Ausgefällene genomische DNA und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt (15 min, $22.610 \times g$, 14 °C). Der Überstand (ca. 400 µl) wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und 1000 µl eiskalter Ethanol (100 %) hinzugegeben. Anschließend wurde erneut

zentrifugiert (15 min, $22.610 \times g$, 14°C), der Überstand verworfen und das Pellet mit Ethanol (70 %) durch vorsichtiges Invertieren gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min, $17.000 \times g$, RT) wurde der Überstand verworfen, das Pellet getrocknet und die Plasmid-DNA in TE-Puffer mit RNase resuspendiert. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.11.1.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae*

Für die Isolation von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae* wurden Kolonien aufgeschlossen, welche auf Festmedium gewachsen waren. Diese wurden mit 2 mL ddH₂O und einem Drigalski-Spatel abgeschwemmt und in 2 mL-Reaktionsgefäße transferiert. Die Zellen wurden pelletiert (1 min, $17.000 \times g$, RT), der Überstand verworfen, die Zellen in 300 µL Lösung I (aus *E. coli*-Plasmidisolation) aufgenommen und in Reaktionsgefäße mit Schraubverschluss überführt. Nach Zugabe von Aufschlussperlen wurden die Zellen im Homogenisator aufgeschlossen (2× 30 sek, 5700 rpm) und 600 µL Lösung II hinzugegeben. Nach Invertieren und Zugabe von 450 µL Lösung III wurde zentrifugiert (15 min, $22.610 \times g$, 14°C). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert, 1000 µL eiskalter Ethanol (100 %) hinzugegeben. Die weitere Vorgehensweise ist Abschnitt 2.11.1.1 zu entnehmen.

2.11.1.3 Isolation genomischer DNA aus *N. crassa*

Die Präparation von genomischer DNA aus *N. crassa* wurde gemäß eines Schnellprotokolls durchgeführt. Hierfür wurde mittels Holzstäbchen zunächst unter sterilen Bedingungen Sporen in 800 µL DNA-Extraktionspuffer (in Reaktionsgefäßen mit Schraubverschluss) übertragen und die Sporen nach Zugabe der Perlen aufgeschlossen (2× 30 sek, 5700 rpm). Die Suspension wurde zentrifugiert (5 min, $17.000 \times g$, RT), um Schaum zu beseitigen, und 80 µL einer 3 M Natriumacetatlösung (pH 6,3) sowie 500 µL Phenol/Chloroform hinzugegeben. Nach gründlichem Vortexen wurde zentrifugiert (5 min, $17.000 \times g$, RT), ca. 400 µL der oberen wässrigen Phase abgenommen und die DNA mit 800 µL Ethanol (eiskalt, 100 %) durch Zentrifugation (15 min, $22.610 \times g$, 14°C) gefällt. Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen (siehe oben) und das getrocknete Pellet in 50 µL TE mit RNase resuspendiert. Die DNA wurde bei 4°C gelagert.

2.11.2 DNA-Amplifizierung mittels Polymerase-Kettenreaktion

In der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden DNA-Abschnitte spezifisch amplifiziert. Diese Methode wurde sowohl für Klonierungsarbeiten als auch zur Überprüfung von Transformanten von *N. crassa* eingesetzt. Als Template dienten je nach Anwendung entweder Plasmide oder genomische DNA. Sollte die amplifizierte DNA in Plasmide eingesetzt werden, so wurde die Phusion-Polymerase verwendet, für Nachweisreaktionen wurde die DreamTaq-Polymerase eingesetzt (beide von Thermo Scientific). Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze unterschied sich aufgrund der Verwendung der beiden Polymerasen (Tab. 2.17). Die Wahl der Primer variierte je nach Anwendung und ist dem Anhang zu entnehmen.

Tab. 2.17: Verwendete Zusammensetzungen der PCR-Ansätze abhängig von der eingesetzten Polymerase. Das Template wurde in verschiedenen Verdünnungen je nach Applikation eingesetzt, wodurch sich verschiedene Volumina (x) ergeben haben.

| | Phusion [μL] 2 U/ μL | DreamTaq [μL] 5 U/ μL |
|------------------------|---|--|
| Template | x | x |
| forward Primer (10 mM) | 2,5 | 0,5 |
| reverse Primer (10 mM) | 2,5 | 0,5 |
| Puffer | 10,0 | 1 |
| dNTPs (10 mM) | 1,0 | 0,2 |
| ddH ₂ O | 33,5-x | 7,75-x |
| Polymerase | 0,5 | 0,05 |
| Σ | 50,0 | 10,0 |

Das PCR-Programm wurde für die zu amplifizierenden DNA-Abschnitte und das verwendete Primerpaar angepasst. Das Primerpaar bestimmte die Anlagerungstemperatur, welche vorher empirisch ermittelt wurde. Für die Elongationszeiten wurden für die Phusion eine Reaktionsgeschwindigkeit von 2 kbp/min vorausgesetzt und für die DreamTaq 1 kbp/min. Das allgemeine PCR-Programm ist Tab. 2.18 zu entnehmen.

Tab. 2.18: Verwendete PCR-Programme. Die variable Zeit richtete sich nach der Länge der zu amplifizierenden DNA-Abschnitten. Die ersten beiden Schritte wurden mit der Phusion-Polymerase bei 98 °C durchgeführt, bei der DreamTaq-Polymerase wurden 95 °C verwendet.

| Bezeichnung | Temperatur [°C] | Zeit [mm:ss] | Zyklen |
|--------------------------|-----------------|--------------|--------|
| Denaturierung der DNA | 98/95 | 1:00 | 1 |
| Denaturierung der DNA | 98/95 | 0:30 | 35 |
| Anlagerung der Primer | 50-70 | 0:30 | |
| Elongation | 72 | variabel | |
| abschließende Elongation | 72 | 10:00 | 1 |
| Abkühlung des Ansatzes | 4 | 5:00 | |
| Lagerung | 16 | ∞ | |

Sollte eine Kolonie-PCR durchgeführt werden, so wurde etwas Zellmaterial von der Transformationsplatte mit *E. coli* entnommen und im PCR-Ansatz resuspendiert. Verbliebene Zellsuspension wurde auf einer Agarplatte transferiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. In diesem Fall wurde bei der Zusammenstellung des PCR-Ansatzes das Templatevolumen mit 0 µL angenommen. Das PCR-Programm wich nur im ersten Denaturierungsschritt ab, welcher nun 5:00 min betrug.

2.11.3 Restriktionsverdau von DNA

Ein essentieller Schritt bei der Erzeugung von neuen Vektoren ist die Behandlung der DNA mit Restriktionsendonukleasen, welche DNA an spezifischen Stellen spalten. In den meisten Fällen wurde die DNA mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen gleichzeitig geschnitten, wodurch eine Dephosphorylierung nicht mehr angeschlossen werden musste. Bei einem typischen 50 µL-Ansatz wurden je 1-2 µL der Restriktionsenzyme (10 U/µL) und 5,0 µL Fast Digest Puffer verwendet. Wurde die DNA durch eine vorangegangene PCR erhalten, so wurden 30 µL, bei Plasmiden meist 10 µL eingesetzt und mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 50 µL aufgefüllt. Die Restriktionsansätze wurden für 2 h bei 37 °C inkubiert, anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und über ein Kit (Hi Yield Gel/PCR DNA Fragment Extraction, SLG) isoliert.

2.11.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in einem elektrischen Feld proportional zum negativen Logarithmus ihrer Molekülmasse. Dafür wurde das 0,7 bis 0,8%ige (w/v) Agarose-Gel mit Ethidiumbromid (0,5 µg/mL) versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung von 130 V abhängig von der gewünschten Auftrennungsqualität (meist für ca. 30 min) in TAE-Puffer. Für die Detektion der DNA wurde das Gel unter UV-Belichtung ($\lambda = 312$ nm) in der Geldokumentationsanlage fotografiert. Zum Beschweren der DNA wurde ein DNA-Ladepuffer (10x) verwendet.

2.11.5 Ligation

Für die Ligation wurden 1,0 µL des linearisierten Zielvektors (meist ca. 1 µg) und 7,9 µL des Inserts eingesetzt. Der Ligationsansatz wurde mit 1,0 µL T4-Ligasepuffer und 0,1 µL T4 DNA-Ligase (5 U/µL) vervollständigt. Der gesamte Ansatz wurde für ca. 1 h bei RT oder über

Nacht bei 16 °C inkubiert. Die Ligationsreaktion wurde für 10 min bei 65 °C abgestoppt und anschließend für die *E. coli*-Transformation eingesetzt.

2.11.6 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNA-Suspensionen wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurden 5 µL der zu bestimmenden Suspension zu 995 µL ddH₂O gegeben und die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt. Eine Absorption von 0,1 entspricht hierbei einer DNA-Konzentration von 1 µg/µL.

2.11.7 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA nach einer Klonierung wurde von der Firma GATC Biotech durchgeführt. Hierbei wurde meist das LightRun-Verfahren verwendet, in welchem bereits die Mischung aus Primer und Plasmid-DNA versendet wird. Die verwendeten Primer sind den Vektorkarten im Anhang zu entnehmen, die Primerbezeichnung sind an der Endung „seq-f“ zu erkennen. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte über die Software FinchTV, ein Sequenzvergleich wurde mit dem bioinformatischen Tool MultAlin durchgeführt.

2.11.8 Codon-Optimierung

Die Anpassung der Nukleotidsequenz der Antikörpergene *d1.3* und *ht186-d11* an die *Codon usage* von *N. crassa* wurde von der Firma Life Technologies durchgeführt. Dazu wurde die originale Gensequenz an Life Technologies übermittelt. Die Anpassung erfolgte über Neusynthese der Gene innerhalb des GeneArt ®-Programmes, welche das GeneOptimizer®-Verfahren enthält. Die DNA wurde anschließend in Plasmidform erhalten. Für die weitere Verwendung des Codon-optimierten Gens wurde eine PCR durchgeführt.

2.11.9 Yeast Recombinational Cloning

Mit der Methode der rekombinanten Hefeklonierung können mehrere DNA-Fragmente in einem Schritt in einer definierten Reihenfolge zusammengefügt werden. Die Methode basiert darauf, dass der Hefestamm FY834 DNA-Abschnitte, deren Enden homolog sind (mindestens 20 bp), zu einem einzigen DNA-Strang rekombinieren kann (Ma *et al.*, 1987). Das Produkt ist in ein Plasmid (pRS426) eingebaut, welches aus der Hefe isoliert werden kann und für weitere Klonierungsschritte weiterverwendet wird. In einem ersten Schritt werden alle DNA-

Abschnitte, welche zusammengesetzt werden sollen, mittels PCR amplifiziert. Dabei ist es entscheidend, dass die Primer einen Überlappungsbereich aufweisen zum benachbarten DNA-Abschnitt nach dem Zusammenfügen, welcher im ersten Zyklus der PCR nicht bindet. Die beiden äußeren Primer beinhalten daher einen Überlappungsbereich zum Hefeplasmid, sowie optional Schnittstellen für das Herausschneiden des Produktes nach dem Zusammenfügen. Eine schematische Übersicht ist in Abb. 2.1 dargestellt.

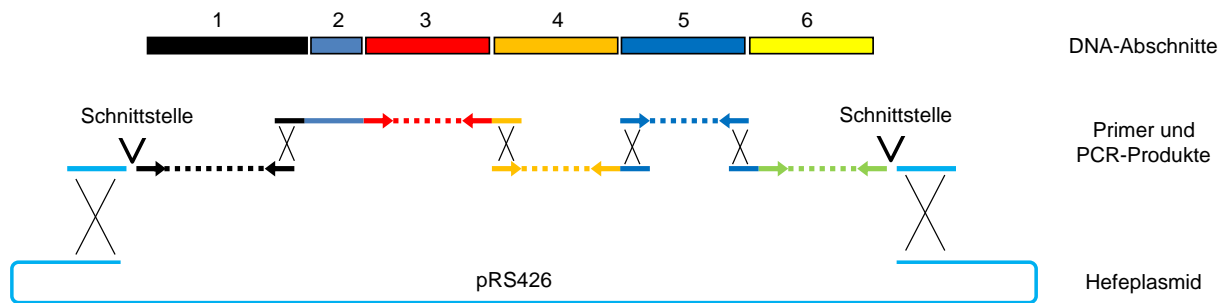


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Funktionsweise des Yeast Recombinational Clonings. Die Primer sind als Pfeile dargestellt und sind farblich markiert, sodass die Überlappungsbereiche der DNA-Abschnitte verdeutlicht werden.

In dieser Arbeit wurden mehrere Hefeklonierungen durchgeführt. Die Endprodukte sowie die verwendeten Primerpaare sind in siehe Tab. 2.19 aufgelistet.

Tab. 2.19: Einzelabschnitte und Primerpaare für die PCR der Hefeklonierung sowie die Isolation des Produktes aus dem Plasmid

| Produkt | Abschnitte | Primerpaar | Isolation aus Plasmid |
|--|--|--|---|
| gla5'-d1.3-Tgla-hph-gla3' bzw. gla5'-ht186-Tgla-hph-gla3' | gla5' d1.3 / ht186 Tgla hph gla3' | 684 + 685 686 + 687 / 688 + 689 690 + 691 82 + 83 692 + 708 | <i>E. coli</i> Retransformation, Restriktion mit <i>NotI</i> und <i>MunI</i> (für Spaltung des Plasmid-Rückgrates) |
| Pgla-gla1-d1.3-Tgla | Pgla-gla1 d1.3 Tgla | 694 + 685 686 + 687 690 + 707 | <i>E. coli</i> Retransformation, Restriktion mit <i>NotI/SpeI</i> und <i>MunI</i> (für Spaltung des Plasmid-Rückgrates) |
| Pgla-glat-ht186 | Pgla-glat ht186 | 694 + 794 795 + 796 | Amplifikation des Gesamtproduktes mit dem Primerpaar 694 + 796 |
| Pvvd-glat-ht186 | Pvvd glat ht186 | 797 + 798 799 + 794 795 + 796 | Amplifikation des Gesamtproduktes mit dem Primerpaar 797 + 796 |
| Pccg1nr (Δ CRE, Δ NRS) | Δ CRE Δ NRS | 920 + 921 923 + 925 | Amplifikation des Gesamtproduktes mit dem Primerpaar 920 + 925 |

Nach Erzeugung der Einzelamplifikate wurde eine Hefetransformation (siehe Abschnitt 2.12.1.2) und anschließende Isolation der Plasmid-DNA (Abschnitt 2.11.1.2) durchgeführt. Je nach Anwendung wurde anschließend entweder eine Retransformation der isolierten Plasmid-DNA in *E. coli* durchgeführt (für eine Vervielfältigung des Plasmids) oder das Produkt mittels PCR aus dem Hefeplasmid amplifiziert (siehe Tab. 2.19).

2.12 Mikrobiologische Methoden

2.12.1 Transformation

2.12.1.1 *Escherichia coli*

Für die Transformation von *E. coli* wurde die Elektroporationsmethode angewendet. Zu 50 µL elektrokompetenten XL1-Zellen (siehe Tab. 2.3) wurden 1-10 µL eines Ligationsansatzes bzw. 1 µL einer reinen Plasmidlösung gegeben, die Suspension in eine vorgekühlte Küvette (2 mm Spaltbreite) transferiert und anschließend elektroporiert (2,3 kV, 200 Ω, 25 µF). Die Zellen wurden mit vorgewärmten LB-Medium aus der Küvette gespült und anschließend für 1 h bei 37 °C auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Anschließend wurden sie in verschiedenen Volumina auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin ausplattiert und diese über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die entstandenen Kolonien wurden entweder für eine Plasmidisolation oder eine Kolonie-PCR eingesetzt, um den Erfolg der Klonierung/Transformation zu überprüfen.

2.12.1.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Die Transformation von *S. cerevisiae* wurde im Rahmen der rekombinanten Hefeklonierung durchgeführt. Für eine Vorkultur wurde der Hefestamm FY834 (Tab. 2.6) in YPD-Medium (ca. 5 mL) bei 30 °C und 150 rpm über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Hauptkultur (50 mL YPD) auf eine OD_{600nm} von ca. 0,1 inokuliert und die Kultur inkubiert (30 °C, 100 rpm) bis mindestens eine Vervierfachung der OD_{600nm} erreicht wurde. Die Kultur wurde zentrifugiert (5 min, 2.000 × g, RT), das Zellpellet in 25 mL sterilem ddH₂O resuspendiert und ein weiteres Mal zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 1 mL 100 mM LiOAc resuspendiert und in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß transferiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (15 sek, 17.000 × g, RT) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 100 mM LiOAc resuspendiert (Volumen = OD/2,5 [µL]). Je 50 µL der aufbereiteten Zellen konnten nun für die Transformation eingesetzt werden. Dazu wurden die Zellen zentrifugiert (15 sek, 17.000 × g, RT), der Überstand verworfen, ein Transformationsmix hinzugegeben (240 µL 50 % (w/v) PEG 3350, 36 µL 1 M LiOAc, 50 µL

Carrier-DNA (siehe Tab. 2.8)) sowie die einzelnen PCR-Fragmente, welche zusammengesetzt werden sollten, inklusive linearisiertem Vektor pRS426 (geschnitten mit *EcoRI* und *XhoI*). Das Volumen wurde mit ddH₂O auf 34 µL gebracht. Der gesamte Ansatz wurde für 30 min bei 30 °C und anschließend für 30 min bei 42 °C inkubiert (alles ohne Schütteln). Der Ansatz wurde zentrifugiert (15 sek, 17.000 × g, RT), das Pellet mit ddH₂O gewaschen, in 300 µL ddH₂O resuspendiert und auf je zwei SC-Agarplatten ohne Uracil ausplattiert (mit Kugeln). Die Platten wurden bis zu 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA isoliert (Abschnitt 2.11.1.2).

2.12.1.3 *Neurospora crassa*

Für die Transformation von *N. crassa* werden Konidiosporen verwendet. Dazu wurden 500 mL-Erlenmeyerkolben mit 100 mL Agar bestehend aus Vogel's Minimalmedium mit dem zu transformierenden Stamm mit einem Holzstäbchen mit Sporen aus der entsprechenden Glycerindauerkultur oder Silicastock beimpft. Für ein schnelleres Wachstum konnte vorher eine Sporensuspension in ddH₂O hergestellt werden, welche dann auf dem Agar verteilt wurde. War der zu transformierende Stamm Histidin-auxotroph, so enthielt das Medium 0,5 mg/mL Histidin. Nach 10 bis 14 Tagen wurden die Sporen geerntet. Dazu wurden mit einem sterilen Spatel sämtliche Sporen und Myzel aus dem Kolben gekratzt und in 30 mL 1 M Sorbitol resuspendiert (vorgekühlt auf Eis). Die Suspension wurde kräftig geschüttelt und anschließend über Mullkompressen filtriert. Dabei passieren die Sporen das Filtermaterial, Hyphen verbleiben allerdings im Filter. Die filtrierte Sporensuspension wurde zentrifugiert (5 min, 2.000 × g, 4 °C), der Überstand verworfen und anschließend noch dreimal mit je 45 mL 1 M Sorbitol gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Sorbitol abgegossen und die Sporen im Restsorbitol mit einer Pipette resuspendiert. Die für die Transformation eingesetzte DNA musste vorher entweder durch Phenol/Chloroform oder einem Kit entsalzt werden. Zu 90 µL Sporensuspension wurden 10 µL DNA-Suspension hinzugegeben (2-3 µg DNA) und der gesamte Ansatz in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (Spaltbreite von 1 mm) transferiert. Als Kontrolle wurde ein Ansatz mit Sporen und ddH₂O elektroporiert. Nach der Elektroporation (1,5 kV, 600 Ω, 25 µF) wurden die Sporen mit eiskaltem Sorbitol aus den Küvetten gespült. Anschließend wurde die Sporensuspension in 25 mL handwarmen Topagar gegeben und auf je 4 Platten mit Bottomagar verteilt. Wurde für die Selektion die Hygromycin-Resistenz verwendet, so enthielt der Bottomagar Hygromycin (200 µg/mL). Wurde bei der Transformation hingegen die Histidin-Auxotrophie komplementiert, so durfte das Medium

keinen Histidinzusatz enthalten. Alle Platten wurden für 2 bis 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Kolonien wurden anschließend auf Schrägagarröhrchen mit Minimalmedium übertragen (Ausschneiden der Kolonie mit einer Impflanzette). Bei gewünschter Hygromycinresistenz musste das Medium Hygromycin enthalten (200 µg/mL).

2.12.2 Kreuzung von *N. crassa*

Für die Kombination von verschiedenen Mutationen oder Deletionen kann *N. crassa* gekreuzt werden, wodurch es zu einer klassischen Rekombination der Gene der Elternstämme kommt. Entscheidend ist dabei, dass nur Stämme, welche genotypisch den *mating type A* (*mat A*) besitzen, mit den entgegengesetzten *mating type a* (*mat a*) gekreuzt werden können. Grundsätzlich können beide *mating types* als männlicher oder weiblicher Kreuzungspartner eingesetzt werden. Für die Kreuzung wurde der weibliche Kreuzungspartner auf Westergaard's-Agarplatten angeimpft (aus einem Silicastock oder über ein Holzstäbchen aus der Glycerindauerkultur), der männliche Partner auf Schrägagarröhrchen mit Minimalmedium. War der weibliche Kreuzungspartner Histidin-auxotroph, so enthielt das Westergaard's-Medium Histidin (50 µg/mL), die Schrägagarröhrchen enthielten bei auxotrophen männlichen Kreuzungspartnern 0,5 mg/mL Histidin. Die Platten wurden bei 26 °C in einem beleuchteten Inkubator mit einem Hell/Dunkel-Rhythmus inkubiert, die Schrägagarröhrchen wurden bei 30 °C inkubiert. Nach einigen Tagen bildet der weibliche Partner Vorfruchtkörper (Protoperithezien). Sind diese deutlich sichtbar unter einer Stereolupe, so konnte die Befruchtung eingeleitet werden. Dazu wurden die Sporen des männlichen Partners mit ddH₂O vom Röhrchen gespült und mit einer Pipette auf der Platte mit dem weiblichen Partner verteilt (in einem Quadrat, um als Kontrolle nicht befruchtete Bereiche zu erhalten) und die befruchteten Platten weiterhin bei 26 °C inkubiert. Nach ca. einer Woche bilden sich konische Fruchtkörper (Perithezien), in welchen die Ascosporen heranreifen. Diese werden nach einigen weiteren Tagen aus den Fruchtkörpern geschossen und bleiben am Deckel der Petrischale haften. Nach einer weiteren Woche, in welcher die Sporen reifen, wurden diese mit ddH₂O vom Deckel entfernt und bei RT gelagert. Für die Aktivierung der Sporen wurden meist 2 µL der Sporensuspension entnommen, auf 20 µL mit ddH₂O aufgefüllt, der Ansatz für 20 min bei 59 °C aktiviert und anschließend auf Agarplatten ausplattiert (verschiedene Volumina). Je nach gewünschtem Selektionsdruck enthielten diese Platten zusätzlich Hygromycin oder Histidin. Die Platten wurden über Nacht bei RT inkubiert und die ausgekeimten Sporen mittels

Impflanzette in Schrägagarröhrchen übertragen. Nach weiteren 5-7 Tagen Inkubation bei 30 °C konnten die Konidiosporen auf gewünschte Deletionen oder Mutationen analysiert werden.

2.12.3 Genotypisierung von *N. crassa*

In dieser Arbeit wurden in Produktionsstämmen verschiedene Deletionen und Mutationen eingebaut bzw. diese kombiniert. Da die meisten Deletionen/Mutationen keinerlei makroskopischen Phänotyp aufwiesen, mussten verschiedene Screeningverfahren durchgeführt werden, um den Genotyp der Stämme zu erfahren. Generell wurden zwei Verfahren durchgeführt: Spot Assays, bei welchem Sporensuspensionen (10 µL) auf spezielle Agarplatten ausgetropft wurden und PCR-Verfahren, bei welchem bestimmte DNA-Abschnitte amplifiziert wurden. Spot Assays wurden für die Analyse von Mutanten mit *his-3⁻*, *exo-1*, der Kombination von $\Delta vib-1$ und $\Delta gla-1$ sowie der Deletion $\Delta mus-51::bar^+$ eingesetzt. Das PCR-Verfahren wurde für sämtliche Deletionen eingesetzt, welche auf der Hygromycin-Resistenzkassette basierten (z.B. $\Delta vib-1::hph$).

2.12.3.1 *his-3⁻*

Für die Identifizierung von Histidin-auxotrophen Mutanten wurden Sporensuspensionen auf Agarplatten mit Minimalmedium mit BDES in einem Raster ausgetropft. Die Platten wurden für 2 Tage bei 30 °C inkubiert. Fehlendes Wachstum zeigte *his-3⁻*-Mutanten auf.

2.12.3.2 *exo-1*

Der Spot Assay für die Identifizierung von *exo-1*-Mutanten basiert auf der verstärkten Sekretion des Stärke-abbauenden Enzyms Glucoamylase (GLA-1). Sporensuspensionen wurden auf Platten mit Minimalmedium mit Sorbose (20 g/L) und Stärke (5 g/L) ausgetropft (*exo-1*-Medium). Die Platten wurden für 2 bis 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Die Agaroberfläche wurde anschließend mit Lugol'scher Lösung besprüht. Bei der Reaktion dieser Lösung mit Stärke entsteht eine violette Färbung. *exo-1*-Mutanten zeigten sich durch einen markanten Abbauhof um die Kolonie herum. Dieser Test gab auch Anzeichen auf die Kombination aus *exo-1* und $\Delta vib-1$ (kleinerer Abbauhof als *exo-1*). Eine Einführung von $\Delta gla-1$ führte allerdings zum Ausbleiben des Abbaus, weswegen ein weiterer Assay entwickelt werden musste (siehe Abschnitt 2.12.3.3).

2.12.3.3 *exo-1*, $\Delta vib-1$ und $\Delta gla-1$

Die Funktionsweise dieses Assays ist nicht bekannt, wurde jedoch empirisch bestätigt. Bei diesem Assay wird die Sporensuspension auf Agar ausgetropft, welcher Milchpulver (10 g/L), Maltose (20 g/L), Pepton (5 g/L), Trypton (5 g/L), Histidin (0,5 g/L) und Sorbose (20 g/L) enthält. Stämme mit den gewünschten Eigenschaften zeigen eine Aufklärung des Agars um die Kolonie herum auf. Stämme nur mit *exo-1* zeigen eine sehr kleine Aufklärung auf, mit *exo-1* und $\Delta vib-1$ zeigen einen kleinen Abbauhof an und Stämme mit *exo-1*, $\Delta vib-1$ und $\Delta gla-1$ besitzen einen großen Abbauhof um die Kolonie herum. Zusätzlich zu diesem Test mussten immer das PCR-Verfahren für $\Delta vib-1$ und $\Delta gla-1$ durchgeführt werden.

2.12.3.4 Deletionsmutanten mit *bar*-Kassette

Dieser Assay basiert auf der Resistenz durch das *bar*-Gen (Abkürzung für *bialaphos resistance*), welches das Enzym Phosphinotricin N-acetyltransferase kodiert. Bialaphos ist ein Herbizid, gegen welches *N. crassa* ebenfalls sensitiv ist. Wird das Zielgen mit dem *bar*-Gen ausgetauscht, so wird *N. crassa* resistent gegen dieses Herbizid (Avalos *et al.*, 1989). In diesem Assay wurden die Sporensuspensionen auf Agar mit Minimalmedium und Phosphinotricin (200 µg/mL) ausgetropft. Die Platten wurden für 2 Tage bei 30 °C inkubiert. Wachstum der Kolonien zeigte die Deletionsmutanten auf.

2.12.3.5 Deletionsmutanten mit *hph*-Kassette

Die *hph*-Kassette kodiert die Hygromycin B Phosphotransferase, welche eine Resistenz gegenüber Hygromycin B verleiht und stellt das Standardsystem bei der Deletion von Genen dar (Staben *et al.*, 1989). Sporensuspensionen von zu untersuchenden Stämmen wurden daher auf BDES-Agarplatten ausgetropft, welche Hygromycin B (200 µg/mL) enthielten. Wachstum der Kolonien zeigte die Resistenz und somit die Deletion auf. Zusätzlich musste jedoch ein PCR-Verfahren durchgeführt werden, um zu bestätigen, dass das korrekte Gen ausgeschaltet wurde.

2.12.3.6 *Mating type*-Assay

Dieser Spotassay basiert auf dem Prinzip der Kreuzung und soll lediglich der Feststellung des *mating types* dienen. Dazu wurden die Wildtypstämme N1-01 (*mat A*) und N1-02 (*mat a*) jeweils auf Westergaard's-Platten angeimpft und bei 26 °C inkubiert bis sich Protoperithezien gebildet haben. Anschließend wurden Sporensuspensionen der zu untersuchenden Stämme auf

beide Platten ausgetropft. Nach einer Inkubationszeit von 3-7 Tagen bilden sich Perithezien, wenn auf der *mat A*-Platte (mit N1-01) Stämme mit dem entgegengesetzten *mating type* (*mat a*) ausgetropft wurden. Das Ergebnis ist nur dann eindeutig, wenn auf der Parallelplatte (N1-02, *mat a*) bei den gleichen Stämmen keine Perithezien gebildet wurden.

2.12.3.7 PCR-Verfahren

Mit der Methode der PCR kann überprüft werden, ob DNA-Abschnitte, welche bei einer Transformation eingebracht wurden, in die genomische DNA integriert wurden. Sollten nach einer Transformation Stämme darauf überprüft werden, ob sie die Expressionskassette tragen, so wurde zunächst die genomische DNA der Stämme isoliert und anschließend eine PCR mit der genomischen DNA als Template und Primern durchgeführt, welche innerhalb der Kassette binden. Dadurch lässt es sich zwar feststellen, ob die DNA-Abschnitte integriert wurden, jedoch nicht, an welchem Locus. Die Primerpaare sind für jede Expressionskassette anders und werden im Anhang aufgeführt.

Ebenfalls mit der PCR-Methode lässt es sich feststellen, ob eine *hph*-Kassette am korrekten Locus vorliegt und im Rückschluss, ob eine Gendeletion vorliegt. Dazu werden Primer verwendet, von denen der erste innerhalb der *hph*-Kassette (317) und der zweite ca. 100 bp von der 5'-Flanke der gesamten Integrationskassette (Gen-abhängig) entfernt bindet (Abb. 2.2).

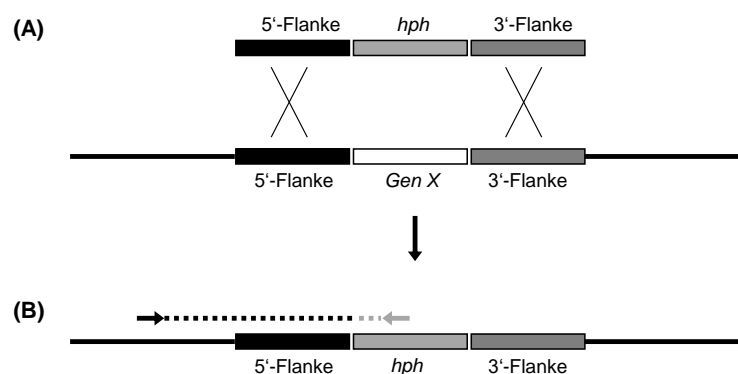


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Integration der *hph*-Kassette bei einer Gendeletion (A) und PCR für den Nachweis der erfolgreichen Integration am korrekten Genort (B).

Der Hintergrund ist, dass bei der Deletion des Genes eine Kassette verwendet wurde, welche aus dem *hph*-Gen sowie zwei Flanken für die Integration an den korrekten Genort bestand (Colot *et al.*, 2006). Der zweite Primer muss daher außerhalb von diesen Flanken binden, um sicherzustellen, dass sich die gesamte Kassette am korrekten Locus befindet (Tab. 2.20). Zunächst musste die genomische DNA aller zu untersuchenden Stämme isoliert werden (Abschnitt 2.11.1.3). Diese wurde als Template-DNA in einer PCR eingesetzt, die amplifizierte

DNA in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Länge der DNA-Amplifikate mit der erwarteten Länge verglichen.

Tab. 2.20: Verwendete Primerpaare bei der Überprüfung der Deletion verschiedener Gene. Der zweite Primer war in allen Fällen #317 (bindet in der *hph*-Kassette).

| Gen | <i>apr-3</i> | <i>apr-9</i> | <i>gla-1</i> | <i>spr-7</i> | <i>NCU00263</i> | <i>vib-1</i> | <i>vvd</i> |
|-----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-----------------|--------------|------------|
| Primer 1 | 743 | 742 | 863 | 741 | 744 | 727 | 808 |

2.12.4 Erzeugung und Überprüfung von *N. crassa*-Transformanten

2.12.4.1 Integration der Expressionskassette am *gla-1*-Locus

Für die Transformation wurden lineare DNA-Fragmente eingesetzt. Das Prinzip der Integration ist analog zur Integration einer *hph*-Kassette (Abb. 2.2) Die DNA-Fragmente wurden mit dem Restriktionsenzym *NotI* aus dem entsprechenden Plasmid ausgeschnitten, mittels Gelelektrophorese und Kit aufgereinigt und anschließend 2-3 µg DNA in der Transformation des Stammes N1-08 ($\Delta mus-51$) eingesetzt (Ninomiya *et al.*, 2004). Die Expressionskassette enthielt die *hph*-Kassette, weswegen der Bottomagar Hygromycin enthielt. Transformanten wurden ebenfalls auf Schrägagarröhrchen mit Hygromycin transferiert, um den Selektionsdruck aufrecht zu erhalten.

Transformanten wurden mittels PCR auf die Integration der Expressionskassette überprüft. Bei *N. crassa*-Transformationen entstehen meist Heterokaryen. Da jedoch Homokaryen erwünscht waren, wurde eine Einzelsporisolation durchgeführt. Hierbei werden mehrkernige Konidiosporen auf BDES-Medium unter Selektionsdruck ausplattiert (in diesem Fall Hygromycin). Die dafür notwendige stark verdünnte Sporensuspension wurde vorher über Pipettenspitzen (1 mL) filtriert, welche mit Mullkompress-Material gefüllt waren. Ausgekeimte Sporen werden auf Schrägagarröhrchen transferiert und erneut die Sporenbildung angeregt. Nach ungefähr einer Woche wurde eine erneute Einzelsporisolation durchgeführt, sodass alle Transformanten zwei Isolationsdurchgänge durchliefen. Diese wurden abschließend erneut mittels PCR auf Vorhandensein der Expressionskassette überprüft.

2.12.4.2 Integration der Expressionskassette am *his-3*-Locus

Das Selektionssystem für die Integration am *his-3*-Locus basiert auf dem Basenaustausch im *his-3*-Gen, welcher zu Histidin-auxotrophen (*his-3⁻*) Mutanten führt. Diese Stämme werden mit einem Plasmid transformiert, welches nach erfolgreicher Integration eines DNA-Abschnittes den Stamm zur Prototrophie befähigt (Aramayo & Metzenberg, 1996), indem der Bereich mit

der Mutation über homologe Rekombination ausgewechselt wird. Im gleichen Schritt wird der sich zwischen den Flanken befindende DNA-Abschnitt an den *his-3*-Locus integriert (Abb. 2.3). Die Selektion erfolgt über Wachstum auf Minimalmedium ohne Histidin.

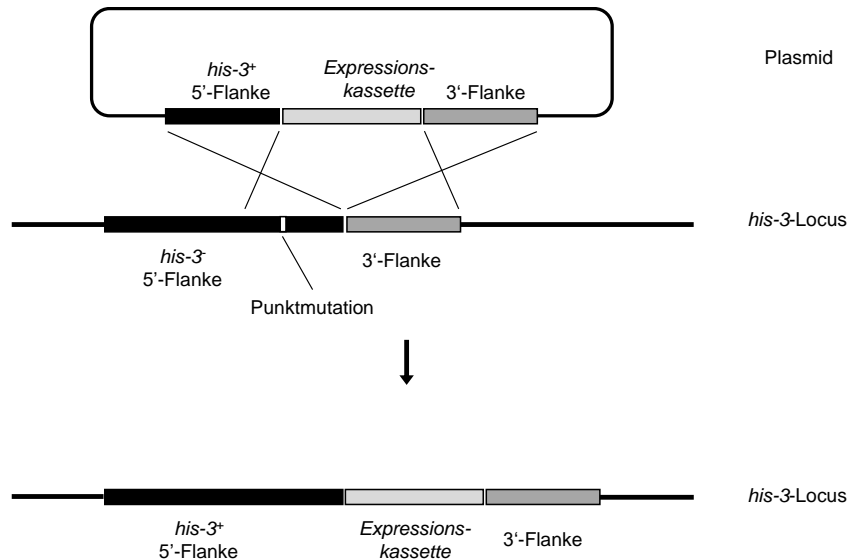


Abb. 2.3: Schematische Darstellung des Integrationsprinzips am *his-3*-Locus.

Die Transformanten wurden auf Minimalmedium ohne Histidin transferiert. Nach Bestätigung mittels PCR, ob die Expressionskassette in die genomische DNA integriert wurde (Locus-unabhängig), wurde wie in Abschnitt 2.12.4.1 eine Einzelsporisolation durchgeführt (Selektionsdruck über fehlendes Histidin), um homokaryotische Stämme zu erhalten. Diese wurden abschließend nochmals mittels PCR auf Vorhandensein der Expressionskassette überprüft.

2.12.5 Dauerkulturen

2.12.5.1 *Escherichia coli*

Eine Kolonie des zu sichernden Klon wurde in 5 mL LB-Medium mit Ampicillin transferiert. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C und 100 rpm inkubiert. 500 µL der Kultur wurden zu 500 µL 40 % Glycerin (w/w) gegeben und in einem Schraubröhrchen bei -80 °C gelagert.

2.12.5.2 *Neurospora crassa*

Alle erzeugten Stämme wurden als Glycerin-Dauerkulturen gelagert. Dazu wurden die Sporen des zu sichernden Stammes mit 1 mL ddH₂O vom Schrägagarröhrchen mittels Vortexen

gespült. 500 µL der Sporensuspension wurden zu 500 µL 40 % Glycerin (w/w) gegeben und in einem Schraubröhrchen bei -80 °C gelagert.

Eine weitere Form von einer Dauerkultur bei *N. crassa* sind Silicastocks. Hierbei sind Sporen an die Oberfläche von Kieselgelpartikeln angeheftet. Hierfür werden sterile Kieselgelkristalle (6 h bei 150 °C im Trockenschrank) mit einer Sporensuspension (7 % Milchpulver (w/v), ca. 700 µL,) in zu lagernden Röhrchen benetzt, gevortext und auf Eis abgekühlt. Nach mehreren Vortexvorgängen wird das Röhrchen eine Woche bei RT inkubiert, damit die Flüssigkeit verdampft. Die Lagerung geschieht bei 4 °C.

2.13 Kultivierungsmethoden

2.13.1 Produktion von scFv mit *E. coli*

Für den Proteaseaktivitätsassay sowie Positivkontrollen für Western Blot und ELISA wurden größere Mengen scFv (*single chain Fv*, Antikörperfragmente) benötigt. Diese wurden in *E. coli* produziert und anschließend aufgereinigt. Bei der Produktion, welche auf dem Plasmid pOPE101-XP basiert (Hust *et al.*, 2007), wird der scFv aufgrund des im Vektor enthaltenen Signalpeptids *pelB* in das Periplasma der Zellen geleitet (Lei *et al.*, 1987). Dort können sich die Disulfidbrücken des Proteins ausbilden. Die scFv werden sowohl aus den Periplasma als auch aus dem Kulturüberstand (Lyse der Zellen) isoliert.

Für die Produktion wurden zunächst Vorkulturen angesetzt, indem 30 mL 2xYT-Medium mit Glucose und Ampicillin (2xYT-GA) mit Zellmaterial aus Glycerindauerkulturen angeimpft wurden. Anschließend wurde über Nacht bei 37 °C und 100 rpm inkubiert. Für die Hauptkultur wurden je 300 mL 2xYT-GA in 2 L-Schüttelkolben auf eine OD_{600nm} von 0,05 mit der Vorkultur angeimpft und bei 100 rpm und 37 °C inkubiert. Nach Erreichen einer OD_{600nm} von 0,5-0,8 wurde die Proteinproduktion durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration von 50 µM) und Saccharose (Endkonzentration von 50 mM) eingeleitet. Dafür wurden die Kulturen bei 100 rpm und 26 °C für 24 h inkubiert.

Für die Isolierung der scFv wurden zunächst die Zellen durch Zentrifugation abgetrennt (10 min, $4.225 \times g$, 4 °C) und der Kulturüberstand für eine Ammoniumsulfatfällung eingesetzt (siehe Abschnitt 2.14.4). Für die Isolierung der scFv aus dem Periplasma wurde eine periplasmatische Präparation (PPP) durchgeführt. Das Zellpellet wurde in 30 mL eiskaltem PE-Puffer durch Vortexen resuspendiert und in eine 100 mL Schottflasche überführt. Für die vollständige Resuspendierung des Pellets wurde dieses für 3 h auf einem Magnetrührer bei 4 °C gerührt. Der Überstand nach der Zentrifugation (30 min, $20.000 \times g$, 4 °C) enthielt alle

Proteine des Periplasmas. Für die anschließende Affinitätschromatographie wurden die gefällten Proteine aus dem Kulturüberstand und die periplasmatischen Proteine vereinigt, gegen PBS dialysiert (Abschnitt 2.14.5) und eine Affinitätschromatographie durchgeführt (Abschnitt 2.14.14.1). Die Proteinkonzentrationen in den Elutionsfraktionen wurden mittels Bradford-Assay bestimmt (Abschnitt 2.14.10).

2.13.2 Kultivierung von *Neurospora crassa*

2.13.2.1 Wachstum auf Schrägagarrröhrchen

Für grundlegende Analysen des Wachstumsverhaltens oder Generierung von kleineren Mengen an Sporen wurden Sporen mit einem Holzstäbchen aus Glycerindauerkulturen oder Silicastocks auf Schrägagarrröhrchen angeimpft. Diese enthielten 3 mL Agar mit verschiedenen Zusätzen (je nach Stamm). Nach dem Animpfen wurden die Röhrchen für mindestens drei Tage bei 30 °C in Dunkelheit und anschließend für die Sporenbildung bei RT inkubiert.

2.13.2.2 Herstellen von Sporensuspensionen für Schüttelkolbenkultivierungen

Für das Animpfen von Flüssigkulturen wurden Sporensuspensionen benötigt. Dazu wurde auf Schrägagarrröhrchen mit dem entsprechenden Stamm 2 mL ddH₂O gegeben, gevortext und mit einer langen Pipettenspitze die Sporensuspension abgenommen. Diese wurde über Pipettenspitzen mit Verbandsmaterial filtriert, zentrifugiert (1 min, 17.000 × g, RT) und in 1 mL ddH₂O resuspendiert. Die Sporenkonzentration wurde mittels Thomazählkammer und einer verdünnten Sporensuspension bestimmt. Dazu wurden mehrere Großquadrate ausgezählt und die Konzentration berechnet (Gleichung 4):

$$\frac{\text{Sporen}}{\text{ml}} = \frac{\text{Gesamtzahl}}{\text{Anzahl der Großquadrate}} \cdot \frac{16 \cdot 10^6}{64} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \quad \text{Gleichung 4}$$

Die Sporensuspensionen haben eine orange Färbung, wodurch Licht bei 540 nm absorbiert wird. Damit nicht für jeden Stamm eine einzelne Zählung durchgeführt werden muss, wurde eine photometrische Schnellmethode zur Bestimmung der Sporenkonzentration entwickelt. Dazu wurde zunächst eine Kalibrierung durchgeführt, in welcher Sporenzahl und Absorption bei 540 nm korreliert wurden. Mit dieser Kalibrierung wurden für alle Kultivierungen in Schüttelkolbenmaßstab die Sporenkonzentrationen bestimmt (Abb. 2.4). Hierfür wurde meist

eine 1:40-Verdünnung der zu bestimmenden Sporensuspension angefertigt und die Absorption bei 540 vermessen.

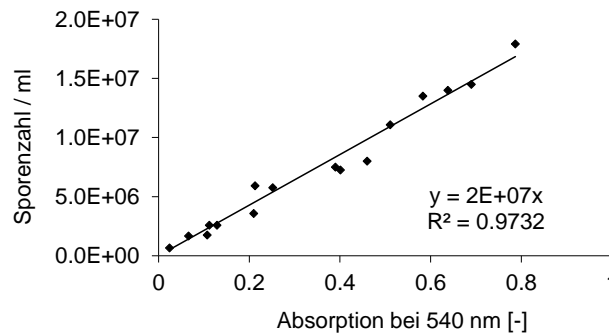


Abb. 2.4: Korrelation zwischen Sporenkonzentration und Absorption bei 540 nm.

2.13.2.3 Kultivierung in Schüttelkolben

Die meisten Kultivierungen in dieser Arbeit wurden in Schüttelkolben durchgeführt. Es wurden 250 mL-Kolben mit und ohne Schikane eingesetzt und ein Volumen von 100 mL verwendet. Inkubiert wurde immer bei 100 rpm, Temperatur und Länge der Kultivierung variierten jedoch. Die Variationen sind an entsprechender Stelle im Text vermerkt. Für das Animpfen wurden filtrierte Sporensuspensionen angefertigt und die Kulturen auf Konzentrationen zwischen 5×10^5 und 1×10^6 Sporen pro mL Medium angeimpft. Die Sporenkonzentration wurde vorher über die Messung bei 540 nm bestimmt. Als Medium wurde Vogel's Minimalmedium eingesetzt. Bei Wachstumskurven wurde immer pro Zeitpunkt ein Kolben angeimpft und abgeerntet, es handelte sich daher um separate Kulturen.

2.13.2.4 Kultivierung auf Festmedium mit Übersichtung mit Flüssigmedium

Auf Agarplatten mit Vogel's Minimalmedium mit Maltose (10 g/L) wurde in Wasser autoklaviertes Cellophan mit einer Pinzette ausgebreitet. Darauf wurden Sporen (1×10^7 Sporen/Platte) mit Perlen ausplattiert und die Platten für bis zu 64 h bei 30 °C in Dunkelheit inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Platten mit je 15 mL Vogel's Minimalmedium mit Maltose (10 g/L) überschichtet und nochmal für 30 min bei 30 °C inkubiert. Im Anschluss wurde das Flüssigmedium abgenommen, sterilfiltriert (Filter mit Porengröße von 0,2 µm) und für weitere Analysen verwendet. Das Myzel wurde mit einem Spatel abgenommen, in Aluminiumfolie eingeschlagen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und für weitere Analysezwecke aufgeschlossen.

2.13.2.5 Kultivierung in einem parallelen Bioreaktorsystem (DASGIP-System)

Das DASGIP-System besteht aus vier Glasreaktoren mit einem Arbeitsvolumen von 700 - 1000 mL und eignet sich durch seine separat regulierbaren Einheiten gut zur parallelen Kultivierung unter bis zu vier verschiedenen Bedingungen. Die Glasreaktoren werden im DASGIP-Bioblock betrieben, welcher die Temperierung der Reaktoren und die Kühlung der Abluft ermöglicht (Abb. 2.5). Das gesamte System besteht aus mehreren Modulen für die Generierung von Online-Daten, der Möglichkeit einer Regulation und der Durchführung eines Feedings (Tab. 2.21).

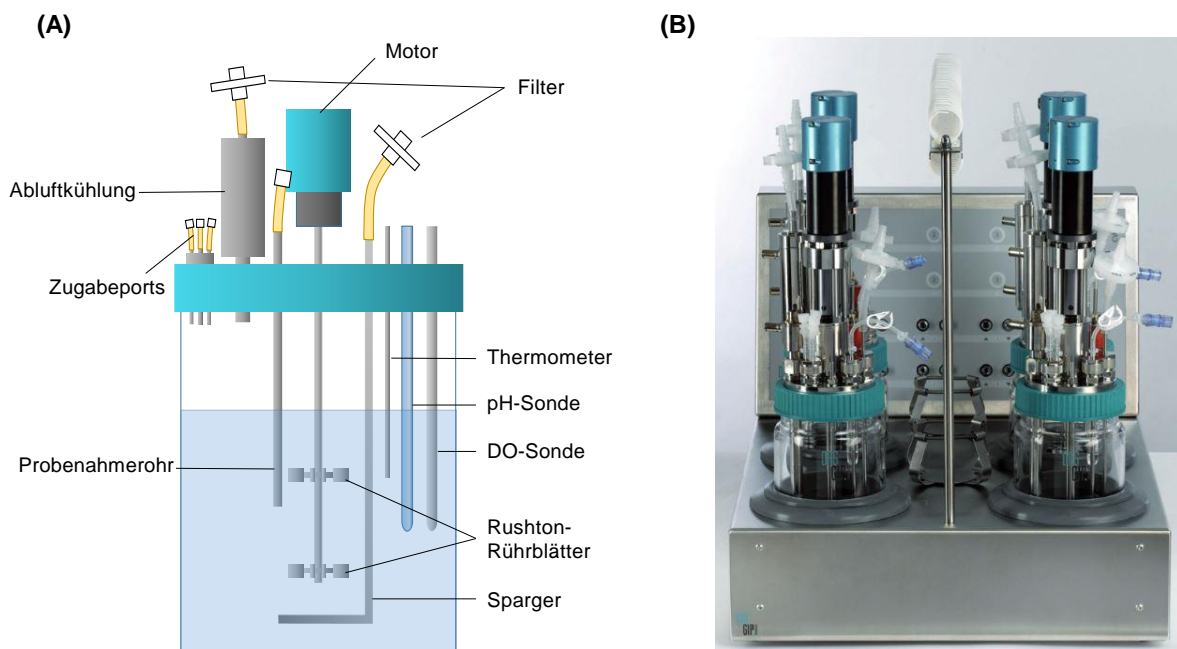


Abb. 2.5: (A) Aufbau eines Reaktors des DASGIP-Systems (Bild: Umrath, 2015). (B) DASGIP-Bioblock (Foto: DASGIP Information and Process Technology GmbH).

Der Rührer, welcher durch einen Motor oberhalb des Deckels angetrieben wird, ist entweder mit zwei Rushton- oder Schrägblatt-Rührblättern bestückt. Die Position der Rührblätter kann variiert werden. Die Begasung mit steriler Druckluft geschieht über einen unterhalb der Rührblätter angebrachten L-Sparger (gesteuert durch das Modul MF4). Die Gelöstsauerstoffkonzentration (DO, *dissolved oxygen*), der pH-Wert und die Temperatur werden über entsprechende Sonden gemessen. Für die Zugabe des Inokulums sowie Säuren oder Laugen sind im Reaktordeckel Anschlüsse angebracht. Entschäumer (Struktol) kann über ein Septum hinzugeführt werden. Für die Probenahme ist im Reaktor ein Tauchrohr mit einem Innendurchmesser von 4 mm angebracht. Die Abluft passiert einen Rücklaufkühler, durch welchen diese entfeuchtet wird, bevor sie analysiert wird. Die zusammengesetzten und befüllten Bioreaktoren können in einem Dampfsterilisator autoklaviert werden.

Die Regelungstechnik ermöglicht die Regelung des pH-Wertes mittels Säuren oder Laugen durch zwei MP8-Pumpmodule. Die Konzentration des gelösten Sauerstoffes wird durch die Rührergeschwindigkeit gesteuert. Fällt der Sauerstoffwert unter einen vorher festgelegten Wert, so wird die Rührergeschwindigkeit automatisch erhöht. Dadurch werden die unter dem Rührer aufsteigenden Luftblasen stärker zerkleinert, wodurch die Flüssigkeit-Gas-Grenzfläche vergrößert und der Sauerstoffübergang erhöht wird. Sowohl die Steuerung der Temperatur als auch der Rührerdrehzahl geschieht durch das Modul TC4SC4. Die ausgetretene Abluft wird durch das Modul GA4 analysiert. Dieses bestimmt die Sauerstoffkonzentration mittels Zirkoniumdioxid-Methode, Kohlenstoffdioxid wird über Absorption im Infrarotbereich gemessen. Da gleichzeitig durch einen Durchflusssensor die Flussrate der Abluft gemessen wird, berechnet die DASGIP Control 4 Software die Sauerstoffübertragungsrate (OTR), Kohlenstoffdioxidbildungsrate (CTR) und den respiratorischen Quotienten. Sämtliche Online-Daten werden durch das Monitoringsystem PH4PO4(L) generiert.

Das gesamte System ist an einen PC gekoppelt, die gesamte Steuerung geschieht mittels Software und kann auch während eines Laufes angepasst werden. Die Reaktoren können separat aber auch parallel gesteuert werden.

Tab. 2.21: Module und Sonden des DASGIP-Bioreaktorsystems.

| Gerät | Typ | Hersteller |
|---------------------------------|---------------------|-------------|
| Bioreaktoren | SR0700ODLS | DASGIP GmbH |
| Heizblock, Abluftkühlung | DASGIP Bioblock | DASGIP GmbH |
| Monitoring | PH4PO4(L) | DASGIP GmbH |
| Temperatur- und Rührersteuerung | TC4SC4 | DASGIP GmbH |
| Abgasanalysator | GA4 | DASGIP GmbH |
| Pumpen | MP8 | DASGIP GmbH |
| Begasung | MX4/4 | DASGIP GmbH |
| DO-Sonde | Visiorm 225 | Hamilton |
| pH-Sonde | Easyform Plus 48225 | Hamilton |

Im ersten Schritt der Vorbereitung einer Kultivierung wurden in der Software die gewünschten Parameter eingegeben. An dieser Stelle wird definiert, auf welchen DO-Wert reguliert wird und die übrigen Kultivierungsparameter wie pH-Wert und Temperatur festgelegt. Vor dem Zusammenbau der Reaktoren musste zunächst die pH-Sonde kalibriert werden. Dazu wurde eine Zweipunktkalibrierung mit den pH-Werten 7,0 und 4,0 durchgeführt. Anschließend wurden alle Bauteile am Reaktor befestigt, mit Medium ohne C-Quelle befüllt und die Reaktoren im Dampfsterilisator autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurden alle Anschlüsse

getätigt, der Motor angebracht und die separat autoklavierte C-Quelle unter sterilen Bedingungen hinzugegeben. Vor der Kalibrierung der DO-Sonde wurden die Reaktoren auf die Kultivierungstemperatur temperiert und Begasung sowie Rührer (100 rpm) eingeschaltet. Die Begasungsrate wurde auf 0,5 VVM eingestellt (*volume air per volume medium and minute*), die entspricht bei einem Arbeitsvolumen von 800 mL einem Wert von 24 L/h. Waren Temperatur und Gelöstsauerstoffwerte konstant, so wurde eine Zweipunktkalibrierung der DO-Sonde durchgeführt mit Luftsauerstoff (100 %) und Stickstoff (0 %).

Für das Animpfen der Kulturen mussten zunächst größere Mengen an Sporen hergestellt werden. Dazu wurden 7 Tage vor der Kultivierung 500 mL-Kolben mit 100 mL Minimalmedium-Agar mit Sporen aus Glycerindauerkulturen beimpft. Es wurde etwas Material aus der Glycerindauerkultur in ca. 1 mL deion. H₂O (deionisiertes Wasser) verdünnt und auf der Agaroberfläche verteilt. Die Kolben wurden bei 30 °C inkubiert. Für die Sporenernte wurden 50 mL steriles deion. H₂O auf den Agar gegeben, der Kolben verschlossen (gegebenenfalls mit Parafilm versiegelt), die Sporen von der Gefäßwand geschüttelt und anschließend bis zu 1 h in einem Schüttelinkubator inkubiert (100 rpm). Dadurch gelangen die Sporen in Suspension. Die Sporensuspension wurde über Mullkompressen filtriert, zentrifugiert (10 min, 3.345 × g, 4 °C) und das Sporenpellet in 20 bis 40 mL deion. H₂O resuspendiert. Mit einer Neubauerkammer wurde die Sporenkonzentration bestimmt. Dazu wurden meist 5 Großquadrate einer verdünnten Sporensuspension ausgezählt und die Sporenkonzentration berechnet (Gleichung 5):

$$\frac{\text{Sporen}}{\text{ml}} = \frac{\text{Gesamtzahl}}{\text{Anzahl der Großquadrate}} \cdot 2,5 \cdot 10^5 \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \quad \text{Gleichung 5}$$

Die Kultivierung wurde durch das Animpfen auf 1×10^6 Sporen pro mL Medium gestartet. In regelmäßigen Abständen wurden mit einer Spritze Proben mit einem Volumen von ca. 5 mL entnommen. Von diesen Proben wurde die Biomasse bestimmt und der Kulturüberstand analysiert.

2.13.2.6 Kultivierung in 10 L-Edelstahlreaktoren

Für ein exemplarisches Scale-Up wurden Reaktoren der Fa. B. Braun Biotech verwendet. Hierbei handelt es sich um Rührreaktoren aus Edelstahl, die meist mit einem Arbeitsvolumen von 9 bis 10 L betrieben werden (Abb. 2.6).

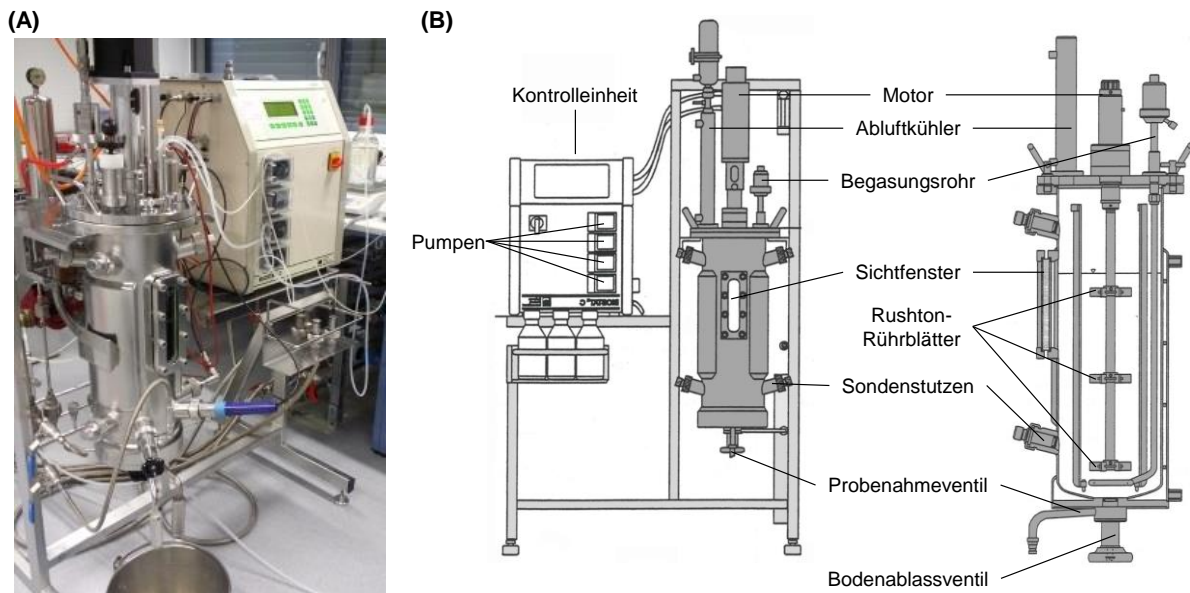


Abb. 2.6: (A) 10 L-Edelstahlreaktor mit Kontrolleinheit, (B) schematischer Aufbau des Reaktors (Bild: Benutzerhandbuch Biostat C, nachbearbeitet).

Genauso wie das DASGIP-System, kann bei dieser Anlage der pH-Wert, die Temperatur und die Gelöstsauerstoffkonzentration reguliert werden. Im Gegensatz zum DASGIP-System wird die Regelung jedoch Zentral von einer fest verbauten Kontrolleinheit betrieben. Diese Regelungseinheit enthält vier Pumpeinheiten, welche separat angesteuert werden können. Sie steuert ebenfalls die Temperierung des Reaktors sowie die Rührergeschwindigkeit und somit auch die Gelöstsauerstoffkonzentration. Separate Geräte sind der Abluftentfeuchter sowie der Abgasanalysator und Waagen, mit welchen die Zugabe der Lauge bzw. der Feedinglösung gesteuert wird. Für die Probenahme sind im Reaktorboden sowie in der Reaktorwand zwei Ventile angebracht, welche separat dampfsterilisiert werden können. Der Reaktor besitzt ein Sichtfenster, wodurch mit einer Innenbeleuchtung auf Knopfdruck das Reaktorinnere eingesehen werden kann. Im Reaktordeckel befinden sich mehrere Einlassöffnungen, an welche Stutzen für die Zugabe von Inokulum, Lauge oder Feedinglösung angebracht werden können. Im Inneren des Reaktors befinden sich zwei Strombrecher, an der Rührwelle sind drei Rushton-Rührblätter befestigt, deren Position nicht variiert werden kann. Die Steuerung der Kultivierung geschah Computer-gestützt mit der Software UBICON. Alle verwendeten Geräte und Sonden sind in Tab. 2.22 aufgelistet.

Vor der Sterilisation des Reaktors wurde eine Zweipunktkalibrierung der pH-Sonde mit den pH-Werten 4,0 und 7,0 durchgeführt. Die amperometrische DO-Sonde mit Teflonmembran wurde vor der Installation an einem Messverstärker (Kneisner Elektronik) mit einem Linienschreiber auf ihre Funktionstüchtigkeit überprüft. Dazu wurde die Sonde zunächst für

mindestens 6 h mit O₂-Elektrolyt polarisiert. Anschließend wurde die Funktionstüchtigkeit mit Luft (100 %) und Stickstoff (0 %) über eine Überwurfhülse getestet und die Reaktionszeiten protokolliert. Der Reaktor wurde mit Medium ohne C-Quelle befüllt, alle Sonden angebracht und für 30 min bei 121 °C dampfsterilisiert. Parallel dazu wurden alle Flaschen, welche später an den Reaktor gekoppelt werden (Inokulum, Lauge, Feeding) inkl. aller Schläuche und Stutzen in einem Autoklaven dampfsterilisiert. Für die Lauge wurde deion. H₂O in der Flasche autoklaviert und NaOH später unter sterilen Bedingungen hinzugegeben. Nach der Dampfsterilisation wurden alle Anschlüsse getätigt und die separat autoklavierte C-Quelle unter sterilen Bedingungen hinzugegeben. Der Reaktor wurde auf die Kultivierungstemperatur temperiert und die Begasungsrate wurde auf 4,5 L/min eingestellt (entspricht erneut 0,5 VVM). Die DO-Sonde wurde wie bei dem DASGIP-System kalibriert.

Für das Animpfen der Kulturen wurden Sporensuspensionen wie im Abschnitt 2.13.2.5 hergestellt. Es wurde auf eine Sporenkonzentration von 1×10^6 Sporen pro mL Medium angeimpft. Dazu wurde die benötigte Sporenmenge in das vorher autoklavierte Gefäß transferiert und mit sterilen deion. H₂O auf 100 mL aufgefüllt. Das Probenahmenvolumen entsprach ca. 35 bis 50 mL. Von diesen Proben wurde die Biomasse bestimmt und der Kulturüberstand analysiert.

Tab. 2.22: Module und Sonden, welche am 10 L-Reaktor betrieben wurden

| Gerät | Typ | Hersteller |
|-------------------------|-----------------|------------------|
| Bioreaktoren & Regelung | Biostat C | B. Braun Biotech |
| Abgasentfeuchter | PSS5 | M&C Techgroup |
| Abgasanalysator | AO2020 | ABB |
| Pumpen | Watson Marlow | 101 U/R |
| Waagen | ED8201-CQ | Sartorius |
| | ED620S-CW | Sartorius |
| DO-Sonde | InPro T-96 | Mettler-Toledo |
| pH-Sonde | 405-DPAS-SC-K8S | Mettler-Toledo |

2.13.3 Berechnungen

2.13.3.1 Bestimmung der Biotrockenmasse

Für die Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) aus Schüttelkolben wurden gesamte Kolben geerntet. Dazu wurde die Biomasse über einen mit Miracloth-Filter (Calbiochem) bestückten Büchnertrichter mittels Vakuumpumpe von dem Kulturüberstand separiert. Die Filter wurden vorher getrocknet und auf einer Analysenwaage gewogen. Die Biomasse wurde anschließend

für mindestens 2 Tage bei 80 °C getrocknet und auf einer Waage das Gewicht, abzüglich des Filtermaterials nach Trocknung im Exsikkator, bestimmt.

Für die Bestimmung der Biomasse aus Reaktoren wurden exakt 3 oder 12 mL der Proben (je nach Probenvolumen) eingesetzt. Als Filtermaterial wurden Cellulosefilter (Filter Discs Grade 389, Sartorius) verwendet.

2.13.3.2 Berechnung der spezifischen Wachstumsrate μ

Das Wachstum einer mikrobiellen Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase basiert auf Gleichung 6:

$$x = x_0 \cdot e^{\mu \cdot t} \quad \text{Gleichung 6}$$

| | |
|-------|---|
| x | BTM-Konzentration [g/L] |
| x_0 | BTM-Konzentration [g/l] bei $t = 0$ |
| μ | spezifische Wachstumsrate [h^{-1}] |
| t | Zeit [h] |
| e | Euler'sche Zahl |

Über die Auftragung des natürlichen Logarithmus der Biotrockenmasse gegen die Kultivierungszeit kann aus der Steigung der Regressionsgeraden die maximale spezifische Wachstumsrate μ_{\max} berechnet werden. Der y-Achsenabschnitt stellt dann die BTM-Konzentration X_0 zum Zeitpunkt $t=0$ dar.

2.13.3.3 Ertragskoeffizient $Y_{X/S}$

Die Bestimmung des Ertragskoeffizienten erfolgte über die Auftragung der Biotrockenmassekonzentration gegen die Substratkonzentration. Die negative Steigung der Regressionsgerade entspricht dem Ertragskoeffizienten (positiver Wert). Alternativ wurde die gebildete CO_2 -Menge anstatt der Biomasse verwendet.

2.13.3.4 Abgasanalyse

Aus den Online-Daten der Abgasanalyse können die Sauerstoffaufnahme Q_{O_2} (Gleichung 7) und die Kohlenstoffdioxidrate Q_{CO_2} (Gleichung 8) berechnet werden. Diese werden für die Berechnung des respiratorischen Quotienten RQ (Gleichung 9) benötigt. Für die gebildete CO_2 -Menge wird die Kohlenstoffdioxidbildungsrate integriert.

$$Q_{O_2} = \frac{\dot{V}^{Ein} \cdot M_{O_2}}{V_F \cdot V_{Mol}} \cdot \left[X_{O_2}^{Ein} - X_{O_2}^{Aus} \cdot \frac{1 - X_{O_2}^{Ein} - X_{CO_2}^{Ein}}{1 - X_{O_2}^{Aus} - X_{CO_2}^{Aus}} \right] \quad \text{Gleichung 7}$$

$$Q_{CO_2} = \frac{\dot{V}^{Ein} \cdot M_{CO_2}}{V_F \cdot V_{Mol}} \cdot \left[X_{CO_2}^{Aus} \cdot \frac{1 - X_{O_2}^{Ein} - X_{CO_2}^{Ein}}{1 - X_{O_2}^{Aus} - X_{CO_2}^{Aus}} \right] \quad \text{Gleichung 8}$$

$$RQ = \frac{Q_{CO_2} \cdot M_{O_2}}{Q_{O_2} \cdot M_{CO_2}} \quad \text{Gleichung 9}$$

| | |
|------------------|--|
| Q_{O_2} | Sauerstoffaufnahme [g/L·h ⁻¹] |
| Q_{CO_2} | Kohlenstoffdioxidbildungsrate [g/L·h ⁻¹] |
| \dot{V}^{Ein} | Volumenstrom Zuluft [L h ⁻¹] |
| V_F | Volumen der Kulturbrühe [L] |
| V_{Mol} | Molvolumen (22,41 L) [L] |
| M_{O_2} | Molekulargewicht O ₂ [32 g/mol] |
| M_{CO_2} | Molekulargewicht CO ₂ [44 g/mol] |
| $X_{O_2}^{Ein}$ | Molenbruch O ₂ Eingang |
| $X_{CO_2}^{Ein}$ | Molenbruch CO ₂ Eingang |
| $X_{O_2}^{Aus}$ | Molenbruch O ₂ Ausgang |
| $X_{CO_2}^{Aus}$ | Molenbruch CO ₂ Ausgang |
| RQ | Respiratorischer Quotient |

2.13.3.5 Kennzahlen für die Aufstellung eines Substrat limitierten Fed-Batch-Verfahrens

Das Fed-Batch-Verfahren wurde in dieser Arbeit im 10 L-Bioreaktor durchgeführt. In einem Substrat limitierten Fed-Batch-Verfahren wird zunächst eine Batch-Kultivierung durchgeführt, in welcher kein weiteres Substrat hinzugefügt wird. Ist das Substrat verbraucht, so wird die Zufütterungsphase (Feedingphase) gestartet. Die Feedinglösung enthielt in dieser Arbeit alle Bestandteile des Komplexmediums in konzentrierter Form (siehe Tab. 2.2). Für die Aufstellung des Fed-Batch-Verfahrens wurde Gleichung 10 verwendet.

$$F_{S,t} = \frac{\mu_{set} \cdot c_{X,0} \cdot V_0}{Y_{X/S} \cdot c_S} \cdot e^{\mu_{set} \cdot t} = F_0 \cdot e^{\mu_{set} \cdot t} \quad \text{Gleichung 10}$$

| | |
|-------------|---|
| $F_{S,t}$ | Feed-Rate zum Zeitpunkt t [L/h] bzw. [g/h] |
| $c_{X,0}$ | BTM-Konzentration bei Feed-Start [g/L] bzw. gebildete CO ₂ -Menge bei Feedstart [g] |
| c_S | Substratkonzentration der Feed-Lösung [g/L] |
| F_0 | Feed-Rate bei Feed-Start [L/h] bzw. [g/h] |
| μ_{set} | spezifische Wachstumsrate während der Feed-Phase [h ⁻¹] |
| t | Zeit [h] |
| $Y_{X/S}$ | Ertragskoeffizient [g _{BTM} /g _{Substrat}] bzw. [gCO ₂ /g _{Substrat}] |
| V_0 | Volumen bei Feed-Start [L] |

Die eingestellte spezifische Wachstumsrate μ_{set} wurde auf 20 % von μ_{max} festgelegt. Da die Berechnung auf Basis der Biomassewerte nicht den Erwartungen entsprach, wurde eine Neuberechnung auf Basis der gebildeten CO₂-Menge durchgeführt. Die hierbei berechneten Werte wurden dann als Feedeinstellung gewählt.

2.14 Biochemische Methoden

2.14.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für eine Auftrennung und Analyse von Proteinproben wurde eine diskontinuierliche SDS-PAGE durchgeführt. Nach der Fokussierung in einem großporigen Sammelgel werden die Proteine im kleinporigen Trenngel gemäß ihrer Molekülmasse aufgetrennt. Es wurde das Protokoll von Laemmli (Laemmli, 1970) mit Modifikationen nach Righetti durchgeführt (Righetti, 1990). Die zu analysierenden Proben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 95 °C aufgekocht. Für die Auftrennung wurden 4 %ige Sammelgele (Tab. 2.23) und 10 %-15 %ige Trenngele (Tab. 2.24) verwendet. Für die Abschätzung der Molekülmasse wurde der Größenstandard *Page Ruler Unstained Protein Ladder* (5 µL, Thermo Scientific) verwendet.

Tab. 2.23: Zusammensetzung eines 4 %igen Sammelgels für die SDS-PAGE

| Lösung | Volumen [µL] |
|--------------------------|--------------|
| ddH ₂ O | 1300 |
| Acrylamid (30 %) | 350 |
| Tris-HCl (1,0 M, pH 6,8) | 270 |
| SDS (10 %) | 20 |
| APS | 20 |
| TEMED | 2,7 |

Tab. 2.24: Zusammensetzung der Trenngele für die SDS-PAGE

| Lösung | 10 %iges Gel [μL] | 12 %iges Gel [μL] | 15 %iges Gel [μL] |
|--------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| ddH ₂ O | 2000 | 1600 | 1100 |
| Acrylamid (30 %) | 1600 | 2000 | 2500 |
| Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8) | 1300 | 1300 | 1300 |
| SDS (10 %) | 50 | 50 | 50 |
| APS | 50 | 50 | 50 |
| TEMED | 2,5 | 2,5 | 2,5 |

Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 130 V durchgeführt. Die Auftrennung wurde beendet, sobald die blaue Laufront das untere Ende des Gels erreicht hatte. Für die Anfärbung der Proteine wurden die Gele in ddH₂O (ca. 20 mL) transferiert, für ca. 30 sek in der Mikrowelle erhitzt (1000 W) und für 5 min auf einer Wippe inkubiert. Anschließend wurde die Waschlösung verworfen, neues ddH₂O hinzugegeben und erneut erhitzt. Dieser Waschschrift wurde ein drittes Mal durchgeführt. Anschließend wurde das Gel mit Färbelösung (Coomassie Brilliant Blue G250) bedeckt (ca. 10 mL), das Gel für ca. 15 sek in der Mikrowelle erhitzt und weitere 15 min auf einer Wippe inkubiert. Dabei werden die Banden nach weniger als einer Minute bereits sichtbar, der Hintergrund färbt sich nur sehr schwach an. Für eine vollständige Entfärbung des Hintergrunds wurden einige Waschschriffe mit ddH₂O angeschlossen bis das gewünschte Ergebnis erreicht war. Häufig führte eine Inkubation bei RT ohne Schütteln über Nacht zu einer Verbesserung der Anfärbung der Proteine.

2.14.2 Western Blot

Mit dieser Methode können Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert werden. Es wurde die Tank Blot-Methode verwendet, bei welcher der Transfer komplett in Western Blot-Transferpuffer stattfindet. Anschließend können die transferierten Proteine in einem Immunostain spezifisch gebunden und sichtbar gemacht werden. Im ersten Schritt wurden die Proteine in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Als Größenstandard wurde der *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (5 μL, Thermo Scientific) verwendet. Das Trenngel wurde anschließend für 15 min in Transferpuffer inkubiert. Die PVDF-Membran wurde in der Zwischenzeit für 15 sek in Methanol aktiviert, für 2 min in ddH₂O gewaschen und abschließend für 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Alle Schwämme sowie Whatman-Papier wurden mit Transferpuffer vollgesogen. Ausgehend von der schwarzen Seite des Trägers wurde anschließend in folgender Reihenfolge aufgebaut: Schwamm, Whatman-Papier, Gel, Membran, Whatman-Papier und Schwamm. Sowohl die Membran als auch die Whatman-

Papier waren exakt auf die Gelgröße zugeschnitten. Transferiert wurde für 16-18 h bei 50 V und 4 °C auf einem Magnetrührer, um die Homogenität des Puffers zu gewährleisten.

2.14.3 Immunostain

Über die Bindung von Antikörpern können Zielproteine spezifisch sichtbar gemacht werden. Dadurch kann das Zielprotein aus einem aufgetrennten Proteingemisch heraus identifiziert werden. Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran (Western Blot) wurden zunächst die Membranen in 2 % MPBS-T für 1 h bei RT inkubiert (Blocken). Anschließend wurde je nach Zielprotein mit dem entsprechenden Antikörper (verdünnt in MPBS-T) für 1,5 h bei RT auf einer Wippe inkubiert (siehe Tab. 2.11). Danach wurde zweimal mit PBS-T gewaschen. Die Wahl des zweiten Antikörpers basierte auf der Methode der Entwicklung. Sollte die Membran in der NBT/BCIP-Methode direkt angefärbt werden, so wurde der Antikörper verwendet, welcher mit einer alkalischen Phosphatase (AP) gekoppelt war. Bei der ECL-Methode musste der Antikörper mit einer Peroxidase (HRP) gekoppelt sein.

2.14.3.1 NBT/BCIP-Methode

Diese Methode ist nur wenig sensitiv. Die Anfärbung der vom Primärantikörper gebundenen Proteine geschieht direkt auf der Membran. Der verwendete Sekundärantikörper war *Anti-Mouse IgG (Fc specific)–Alkaline Phosphatase antibody produced in goat* (Sigma-Aldrich). Der in MPBS-T verdünnte Antikörper wurde für ca. 1,5 h auf der Membran inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS-T wurde die Färbelösung (NBT- und BCIP-Lösung 1:100 in Substratpuffer) auf der Membran auf einer Wippe für 10 – 60 min inkubiert. Wurde die gewünschte Intensität erreicht, so wurde zweimal mit ddH₂O gewaschen, die Membran getrocknet und mittels Geldokumentation digitalisiert.

2.14.3.2 ECL-Methode

Die Elektrokchemolumineszenz-Methode basiert auf der Erzeugung von Licht an der Peroxidase des Sekundärantikörpers. Diese wird mit einem Fotofilm aufgenommen. Durch die variable Belichtungszeit kann die Signalintensität eingestellt werden. Als Sekundärantikörper wurde der *F(ab')₂-Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP conjugate* (Life Technologies) eingesetzt. Dieser wurde in PBS-T verdünnt und die Membran für 1 h inkubiert. Nach zweimaligen Waschen (je 15 min) wurde die Membran auf eine Frischhaltefolie in eine Entwicklungskassette gelegt. Auf die Membranoberfläche wurden 1,4 mL der

ECL-Entwicklungslösung (je 700 μL ECL1 und 2) aufgetragen und für 5 min inkubiert. Anschließend wurde überschüssige Lösung durch Schrägstellen der Kassette mit Zellstoff abgenommen und mit Frischhaltefolie versiegelt. Die Entwicklung fand nur unter Rotlicht in einer Dunkelkammer statt. Die gewöhnliche Entwicklungszeit betrug 2 min. War das Signal nicht stark genug, so wurde bis zu 15 min inkubiert. Bei sehr starken Signalen wurde der Film nur für 1 sek aufgelegt und anschließend entwickelt. Dies geschah durch Schwenken in der Entwicklerlösung für ca. 30 sek, Waschen für 30 sek in deionisiertem Wasser und abschließendem Fixieren in Fixierlösung für weitere 30 sek. Nach Trocknung des Filmes wurde dieser mittels Geldokumentation digitalisiert.

2.14.4 Proteinfällung

Die Fällung von Proteinen aus Kulturüberständen wurde durch die fraktionierte Zugabe von Ammoniumsulfat erreicht. Die Fällung wurde in verschiedenen Maßstäben (1,5 mL / 20 mL / >50 mL) durchgeführt, die vom Prinzip aber alle gleich verliefen. Die Fällung wurde immer bei 4 °C durchgeführt. Die Zugabe des Ammoniumsulfats geschah meist in mehreren Fraktionen. Pro mL der Kultur wurden 0,4 g Ammoniumsulfat eingesetzt. Eine neue Fraktion wurde erst hinzugegeben, wenn sich die Vorangegangene gelöst hat. Im 1,5 mL-Maßstab (2 mL-Reaktionsgefäß) wurde nur eine Fraktion verwendet. Im 20 mL Maßstab (SS34-Zentrifugationsröhrchen) wurden drei Fraktionen verwendet. Die Inkubation geschah in beiden Fällen über Einspannen in einem Rad, sodass die Proben durchgehend homogenisiert wurden. Im Maßstab >50 mL geschah die Fällung auf einem Magnetrührer (sehr langsames Rühren) mit ca. 10 Fraktionen. Nachdem sich das gesamte Salz gelöst hatte, wurde für weitere 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze zentrifugiert (30 min, $20.000 \times g$, 4 °C). Im Maßstab >50 mL wurde für 1 h bei $7.277 \times g$ und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet, welches teilweise nicht sichtbar war, wurde in PBS (1/30 des Ausgangsvolumens) resuspendiert und bei 4 °C gelagert.

2.14.5 Dialyse

War die Entfernung der Salze nach einer Proteinfällung gewünscht (nur bei Proteinisolation), so wurde eine Dialyse durchgeführt. Die nach der Fällung resuspendierten Proteine wurden in einem Dialyseschlauch (*VISKING*, Roth) transferiert und über Nacht auf einem Magnetrührer bei 4 °C gegen 5 L PBS oder Bindepuffer (siehe Affinitätschromatographie) dialysiert. Am folgenden Tag wurde der entsalzte Schlauchinhalt entnommen und bei 4 °C gelagert.

2.14.6 Bestimmung von Glucose in Kulturüberständen

Der Glucose-Nachweis wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt und basiert auf der enzymatischen Umsetzung von Glucose (Bergmeyer *et al.*, 1974). Das verwendete Färbereagenz enthält das Enzym Glucoseoxidase, welches Glucose unter Erzeugung von H_2O_2 umsetzt. Eine Peroxidase verwendet das H_2O_2 für die Umsetzung des Farbstoffes o-Dianisidin von seiner reduzierten zur oxidierten Form, was zu einem Farbumschlag führt. Die Absorption wird bei 450 nm vermessen.

2 μL der zu testenden Probe wurden zu 200 μL Färbereagenz gegeben. Diese wurde vorher frisch aus der o-Dianisidin-Lösung (1 Volumenteil) und der Enzymlösung (9 Volumenteile, siehe Tab. 2.9) angesetzt. Die Ansätze wurden für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und im ELISA-Reader vermessen. Für die Bestimmung der Konzentration wurde eine Kalibrierung mit einer Glucoselösung durchgeführt (Abb. 2.7). Die Messung der Proben wurde in einer Dreifachbestimmung durchgeführt.

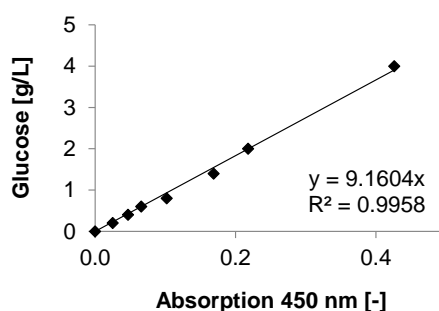


Abb. 2.7: Kalibriergerade für die Bestimmung der Glucosekonzentration in Kulturproben.

2.14.7 Bestimmung von Maltose (Aldosen) in Kulturüberständen

Für die Bestimmung von Maltose in Kulturproben wurde die Methode nach Bernfeld angewandt (Bernfeld, 1955), in welcher Zucker mit reduzierendem Ende (Aldehydgruppen und daher Aldosen) nachgewiesen werden. Obwohl damit auch Glucose und andere Aldosen nachgewiesen werden können, wurde diese Nachweismethode für die Detektion von Maltose verwendet. Da in dieser Arbeit Maltose als Substrat eingesetzt wurde, ist es eher von Vorteil wenn ähnliche Zucker ebenfalls detektiert werden, da auch diese vom Pilz als Substrat verwendet werden können.

Für das Färbereagenz wurden zunächst 8 mL 2 M NaOH in einem Wasserbad auf 60 °C erhitzt und 12 g Natrium-Kaliumtartrat-Tetrahydrat hinzugegeben. Parallel dazu wurden in 20 mL ddH₂O auf einer Heizplatte (60 °C) unter Rühren 0,44 g 3,5-Dinitrosalicylsäure gelöst

(gelblich orange Färbung). Für die endgültige Lösung wurde zu 12 mL ddH₂O langsam beide hergestellten Lösungen hinzugegeben (unter Rühren). Das Färbereagenz wurde in einer braunen Flasche in Dunkelheit gelagert.

200 µL der zu bestimmenden Probe wurden in einer Verdünnung (meist 1:20) zu 100 µL des Färbereagenzes gegeben, vermischt und für 15 min bei 100 °C aufgeköcht. Nach dem Abkühlen des Ansatzes wurden 900 µL ddH₂O hinzugegeben und die Absorption bei 540 nm vermessen. Als Leerwert wurde Wasser mit Färbereagenz verwendet (ebenfalls hitzebehandelt). Die Verdünnung der Probe musste so gewählt werden, dass die Absorption Werte von 1,0 nicht überschritt. Für eine genaue Bestimmung der Maltosekonzentration wurde eine Kalibrierung mit einer Maltoselösung durchgeführt (Abb. 2.8).

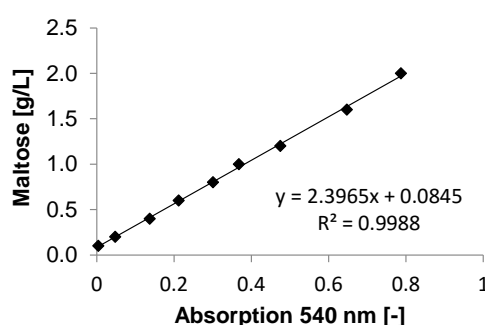


Abb. 2.8: Kalibriergerade für die Bestimmung der Maltose- bzw. Aldosekonzentration in Kulturproben

2.14.8 α -Amylase-Aktivitätsassay

Dieser Assay wurde für die Bestimmung der Glucoamylaseaktivität in Kulturüberständen durchgeführt. Es werden sämtliche Enzyme erfasst, welche eine α -Amylase-Aktivität aufweisen. Da die Glucoamylase im Kulturüberstand die am häufigsten vorkommende α -Amylase ist, wird davon ausgegangen, dass sämtliche Aktivität von der Glucoamylase ausgeht. Die Nachweismethode basiert auf der zeitlichen Umsetzung von Stärke zu Abbauprodukten wie Glucose und Maltose. Diese weisen im Gegensatz zu Stärke einen hohen Anteil an Aldehydresten auf (Stärke hat pro Strang nur einen Aldehydrest) und können daher mit dem Aldosenachweis detektiert werden (Abschnitt 2.14.7).

Die dafür benötigte 1 %ige Stärkelösung (w/v) wurde durch Aufkochen auf einem Magnetrührer in Phosphatpuffer hergestellt. Die Lösung wurde für 15 min bei 100 °C unter Rühren inkubiert, der Flüssigkeitsverlust wurde anschließend ausgeglichen.

Für die Bestimmung der Aktivität wurden zu 50 µL der Stärkelösung 50 µL der gefällten Proteine des Kulturüberstandes sowie 100 µL Phosphatpuffer gegeben und der Ansatz für 15 min bei 30 °C inkubiert. Da bei fast allen Kultivierungen Maltose als Substrat eingesetzt

wurde, ist es essentiell, dass diese zunächst entfernt wird (durch die Fällung der Proteine und Resuspendieren in Puffer), da sie ebenfalls durch den Aldosenachweis detektiert wird. Der Stärkeabbau wurde durch Zugabe des Färbereagenzes (100 µL, Abschnitt 2.14.7) und Aufkochen abgestoppt (100 °C, 15 min). Der weitere Verlauf ist in Abschnitt 2.14.7 zu finden. Die Aktivität wurde in µmol Maltose, die pro Minute freigesetzt wurde, umgerechnet.

2.14.9 Bestimmung von Ammoniak in Kulturüberständen

Der Ammoniak-Nachweis wurde mittels Kit gemäß Herstellerangaben durchgeführt (r-Biopharm AG). Das Ansatzvolumen wurde auf ein Drittel der Ursprungsgröße reduziert und in Halbmikroküvetten durchgeführt. Der Test basiert auf der enzymatischen Umsetzung von NADH zu NAD⁺, bei welcher NH₄⁺ benötigt wird. Das gebildete NAD⁺ wird durch UV-Licht (340 nm) detektiert. Für die Bestimmung der Konzentration wurde die vom Hersteller angegebene Berechnung durchgeführt.

2.14.10 Proteinbestimmung mittels Bradford-Assay

Mittels Bradford-Assay werden sämtliche Proteine in einer Probe durch die Anlagerung der Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue detektiert (Bradford, 1976). Die Methode wurde zum einen für die Konzentrationsbestimmung von produzierten Antikörperfragmenten nach einer *E. coli*-Produktion und zum anderen für die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Zellaufschluss verwendet. Als Reagenz wurde *Roti-Quant* (5fach-Konzentrat, Carl Roth) eingesetzt.

Für die Bestimmung von Proben nach Zellaufschluss wurden die Proben 1:10 in ddH₂O verdünnt und anschließend 6 µL zu 794 µL ddH₂O und 200 µL Färbereagenz gegeben. Nach 10 min Inkubation in Dunkelheit wurde die Absorption bei 595 nm vermessen. Die Berechnung der Konzentration wurde über eine Kalibrierung durchgeführt (Abb. 2.9). Für die Bestimmung sonstiger Proteinproben musste die Verdünnung so gewählt werden, dass die Absorption im kalibrierten Bereich lag.

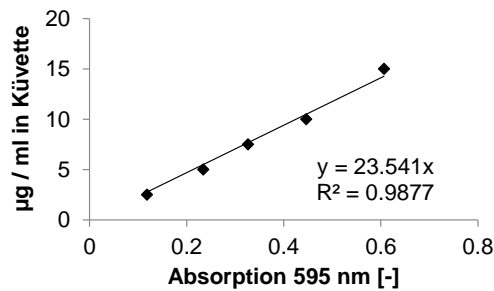


Abb. 2.9: Kalibrierung für die Proteinbestimmung nach Bradford. Die bestimmte Konzentration bezieht sich auf die Konzentration in der Küvette und muss daher umgerechnet werden auf die unverdünnte Probe.

2.14.11 Proteinextraktion von biomasseassoziierten Proteinen

Für die Analyse von biomasseassoziierten Proteinen von *N. crassa* mussten diese zunächst aus dem Myzel extrahiert werden. Dazu wurde das Myzel aus Flüssigkulturen zunächst abgenutscht, in Aluminiumfolie eingeschlagen und in flüssigen Stickstoff eingetaucht. Mit einem Hammer wurde das Myzel anschließend zerkleinert und in Schraubgefäße mit Aufschlussperlen überführt (ca. 500 µL Myzel). Nach Zugabe von 500 µL Proteinextraktionspuffer wurden die Zellen im Homogenisator unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff aufgeschlossen (3× 30 sek, 6300 rpm). Dieser Puffer wurde eigentlich für die Analyse von phosphorylierten Proteinen entwickelt (Pandey *et al.*, 2004). Die Proben wurden anschließend für 30 min auf Eis inkubiert, dabei wurde alle 10 min das Gefäß gevortext. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (8 min, 17.000 × g, 4 °C) und 350 µL des Überstandes für weitere Analysen in ein neues Reaktionsgefäß transferiert. Die Proben wurden bei 4 °C gelagert. Für eine Angleichung der Proteinkonzentration für eine anschließende SDS-PAGE wurde eine Konzentrationsbestimmung mittels Bradford-Assay durchgeführt (Abschnitt 2.14.10).

2.14.12 Protease-Assay

2.14.12.1 Gelmethode

Dieser Assay entspricht der standardmäßig durchgeführten Methode für die Ermittlung von Proteaseaktivität im Kulturüberstand. Eine definierte Menge an scFv (meist HT186-D11) wird mit Kulturüberstand versetzt und für eine definierte Zeit inkubiert. Anschließend wird mittels SDS-PAGE analysiert, ob der scFv abgebaut wurde und daher seine spezifische Bande nicht detektiert werden kann. Alle scFv wurden in *E. coli* produziert und mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Ungefähr 1 µg (meist 2 µL) wurde mit

Kulturüberstand (10,8 µL) für 24 h bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von SDS-Probenpuffer (3,2 µL) und Inkubation bei 95 °C für 10 min abgestoppt. Die Proteine wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt (15 %ige Trenngele) und mittels Coomassie angefärbt. Fehlende Banden bei ca. 30 kD bzw. Abbauprodukte wiesen auf eine Proteaseaktivität hin, welche spezifisch für den eingesetzten scFv ist. Als Kontrolle wurde der scFv mit Medium inkubiert.

2.14.12.2 Azocasein-Methode

Diese quantitative Methode basiert auf der Spaltung des Proteins Casein, welches an einen Azofarbstoff gekoppelt ist (Dementhon *et al.*, 2006). Kommt es zum Abbau, so wird der Farbstoff freigesetzt und verbleibt bei der anschließenden Fällung der Proteine im Überstand, wodurch dieser angefärbt wird. Zu 200 µL Kulturüberstand wurden 200 µL Azocasein-Lösung (5 mg/mL in PBS) gegeben und für 24h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden für die Fällung 1000 µL Trichloressigsäure (5 % (w/v)) hinzugegeben, die Ansätze gevortext und zentrifugiert (1 min, 17.000 × g, RT). Der Überstand wurde in Halbmikroküvetten transferiert und die Absorption bei 440 nm gemessen.

2.14.13 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Für die Bestimmung der Aktivität der produzierten scFv-Fusionsproteine wurde ein Antigen-ELISA in Form eines Titrations-ELISA durchgeführt. In diesem Assay wird nur dann ein Signal generiert, wenn der produzierte scFv (HT186-D11) das Antigen binden kann (MUC1). Die Farbreaktion erfolgt über die Umsetzung von o-Phenylendiamindihydrochlorid (OPD) zu 2,3-Diaminophenazin (DAP), welche durch die mit dem Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase (HRP, *horse radish peroxidase*) katalysiert wird (Abb. 2.10). Dazu wurde zunächst in einer Mikrotiterplatte (Nunc Maxisorp, Thermo Scientific) MUC1 (32mer, 100 ng/Vertiefung, verdünnt in PBS) über Nacht bei 4 °C immobilisiert. Nach dem Ausschlagen der überschüssigen Antigenlösung wurde dreimal mit 100 µL 0,05 % PBS-T (mit einer Multikanalpipette) gewaschen. Anschließend wurde mit 300 µL MPBS-T für 1 h bei RT geblockt. Nach erneutem Waschen wurden die zu untersuchenden Proben/Fractionen aufgetragen. Dazu wurde innerhalb einer Spalte eine Verdünnungsreihe angefertigt. In die Vertiefungen 2 bis 8 wurde PBS vorgelegt (100 µL). In die erste Vertiefung wurde die entsprechende Probe zu 200 µL aufgetragen. Als Positivkontrolle wurde der in *E. coli* produzierte scFv HT186-D11 eingesetzt (1 µg). Anschließend wurden aus der ersten

Vertiefung 100 μL entnommen, in die zweite Vertiefung transferiert und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren verdünnt. Danach wurden erneut 100 μL entnommen und in die dritte Vertiefung gegeben usw.. Aus der letzten Vertiefung wurden 100 μL verworfen, damit in allen Ansätzen das gleiche Volumen enthalten war. Nach einer Inkubationszeit von 1,5 h bei RT wurden die Proben durch Ausschlagen entfernt und dreimal mit PBS-T gewaschen. Der Primärantikörper (*6x-His Epitope Tag Antibody*, Thermo Scientific) wurde in MPBS-T verdünnt und für 1,5 h inkubiert (100 μL pro Vertiefung), im Anschluss wurde erneut dreimal gewaschen. Der verdünnte Sekundärantikörper (*Anti-Mouse IgG (Fc specific)–Peroxidase antibody produced in goat*, Sigma Aldrich) wurde in die Vertiefungen gegeben (100 μL pro Vertiefung) und für 1 h bei RT inkubiert. Nach Ausschlagen und Waschen wurde die Färbung eingeleitet, indem je 100 μL Substratmix aufgetragen wurden. Die Entwicklungsdauer variierte je nach Signalstärke und betrug 15-60 min. Die Färbereaktion wurde mit 1 N Schwefelsäure abgestoppt. Die Absorption wurde bei 490 nm vermessen (SpectraMax 190). Für die Berechnung der Konzentration wurden die Proben mit dem Standard verglichen. Dazu wurde innerhalb der Verdünnung zunächst der lineare Bereich ermittelt. Es gilt zu beachten, dass der Standard einen *his₆-tag* aufwies, die scFv-Fusionen jedoch einen *his₁₀-tag*. Diese Konzentration darf daher nur als Annäherung betrachtet werden.

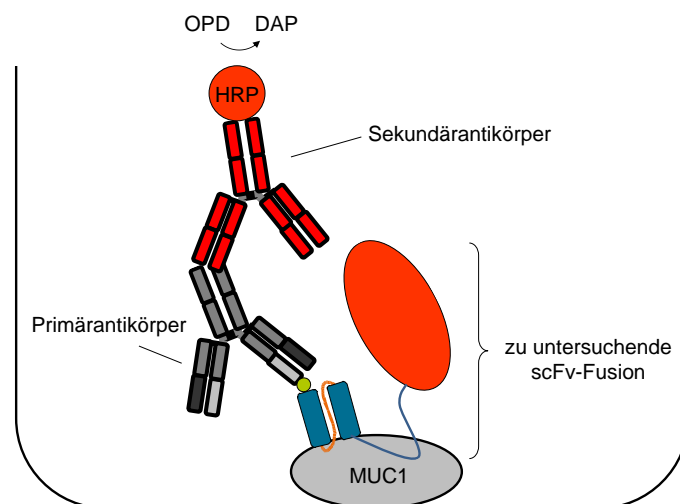


Abb. 2.10: Schematische Darstellung des Antigen-ELISA, Erläuterung siehe Text.

2.14.14 Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)

Für die Isolation von *his₆*- bzw. *his₁₀*-markierten Proteinen aus Kulturüberständen wurde eine Metallchelate-Affinitätschromatographie (*Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*, IMAC) durchgeführt. Als Säulenmaterial wurde mit Nickel beladene *Chelating Sepharose Fast*

Flow (GE Healthcare) verwendet. Für die Isolation von Proteinen im kleinen Maßstab (bis 500 mL Kulturüberstand) wurde loses Säulenmaterial verwendet, im größeren Maßstab wurde die Säule gepackt und die Chromatographie über eine HPLC durchgeführt. Vor der Durchführung der Chromatographie mussten die Proteine mittels Ammoniumsulfat gefällt und durch Dialyse überschüssige Salze entfernt werden (Abschnitt 2.14.5).

Der gesamte Aufarbeitungsprozess für die Isolation von Proteinen aus *N. crassa*-Kulturüberstand umfasst zahlreiche Schritte und beginnt mit einer Abtrennung des Myzels durch grobe Filtration mit anschließender Zentrifugation (20 min, $7.277 \times g$, 4 °C) zur vollständigen Entfernung der Zellreste. Anschließend werden die Proteine des Kulturüberstandes mit Ammoniumsulfat gefällt (Abschnitt 2.14.4) und in einem Puffervolumen resuspendiert, welches nur 1/30 des Ausgangsvolumens entspricht, wodurch die Proteinkonzentration erhöht wird. Für die Entfernung der überschüssigen Salze, welche die Aufreinigung behindern würden, wird eine Dialyse gegen Bindepuffer des Säulenmaterials über einen Zeitraum von ca. 14 h durchgeführt (Abschnitt 2.14.5). Für den Aufarbeitungsprozess wurde loses Säulenmaterial verwendet, welches nach Bindung des Produktes über Zentrifugation vom Kulturüberstand abgetrennt wurde. Im dabei entstandenen Durchlauf befinden sich nun ungebundene Proteine. Für die Reinigung des Produktes wurden drei Waschdurchgänge vollzogen mit steigender Imidazolkonzentration von 10 bis 30 mM (Imidazol konkurriert mit dem *his-tag* um die Bindeplätze der Säule). Die Elution erfolgte in drei Schritten mit einem Puffer, welcher EDTA in einer hohen Konzentration enthält und zum nahezu vollständigen Entfernen des Proteins und des Nickels führt.

2.14.14.1 Proteinaufreinigung mit losen Säulenmaterial

Für die Vorbereitung des Säulenmaterials wurden je Aufreinigung 1 mL reine Sepharose eingesetzt. Dazu wurde diese zunächst zentrifugiert (5 min, $500 \times g$, 4 °C) und die Lagerlösung abgenommen. Die Sepharose wurde mit 5 mL ddH₂O durch Inkubation für 5 min bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler und Zentrifugation (5 min, $500 \times g$, 4 °C) gewaschen. Der Überstand wurde verworfen, die Sepharose in 0,5 mL Nickelsulfatlösung (0,1 M) resuspendiert, inkubiert und zentrifugiert (Bedingungen wie zuvor). Der Überstand wurde abgenommen, das Säulenmaterial dreimal mit ddH₂O gewaschen (Inkubation und Zentrifugation) und in 1ml Bindepuffer aufgenommen. Wurde die aufzureinigende Proteinfraction gegen PBS dialysiert (anstatt Bindepuffer), so wurden NaCl (Endkonzentration von 0,5 M) und Imidazol (Endkonzentration von 10 mM) hinzugegeben. Die vorbereitete Sepharose wurde nun zu den

Proben gegeben und für 45 min auf einem Überkopfschüttler bei 4 °C inkubiert, sodass der *his-tag* an die Sepharose binden konnte. Anschließend wurden die Ansätze zentrifugiert (15 min, $500 \times g$, 4 °C) und die Sepharose in Bindepuffer gewaschen (Inkubation und Zentrifugation für 15 min). Für eine bessere Handhabbarkeit wurde die Sepharose in 15 mL-Reaktionsgefäße überführt. Es folgten Waschschritte mit Waschpuffer mit 20 und 30 mM Imidazol. Die Elution (Inkubation für 1 h) erfolgte mit Elutionspuffer auf EDTA-Basis, wodurch neben dem Produkt auch die Nickelionen von der Säule gelöst wurden. Nach Überführung des Überstandes nach der Zentrifugation wurde zwei weitere Mal eluiert (Inkubationszeit nur noch für 5 min). Von allen Fraktionen wurden für spätere Analysen mittels ELISA und Western Blot Proben entnommen, welche bei 4 °C bzw. -20 °C gelagert wurden.

2.14.14.2 Proteinaufreinigung mit gepacktem Säulenmaterial und HPLC

Für Kulturüberstände mit einem Volumen >500 mL wurde gepacktes Säulenmaterial verwendet. Die Auftrennung wurde mit einer HPLC (*high performance liquid chromatography*, ÄKTAexplorer, GE Healthcare) gesteuert. Der Vorteil liegt in der Überwachung des Prozesses über einen Detektor (UV-Licht bei 280 nm). Dadurch kann der Verlauf und die Qualität der Aufreinigung analysiert werden. Die gepackte Säule (XK 16/20, gleiches Säulenmaterial wie oben) hatte ein Volumen von ca. 10 mL. Der prinzipielle Ablauf ist der gleiche wie bei losem Säulenmaterial, allerdings ist die Volumenangabe in Säulenvolumen (1 SV = 9,65 mL). Vor der Auftragung der Probe auf die Säule musste diese zunächst zentrifugiert (5 min, $3.345 \times g$, 4 °C) und filtriert werden (Porengröße von 0,2 μ m). Das Chromatographieprogramm ist in Tab. 2.25 aufgeführt. Von allen Fraktionen wurden für spätere Analysen mittels ELISA und Western Blot Proben entnommen, welche bei 4 °C bzw. -20 °C gelagert wurden.

Tab. 2.25: Ablauf der Affinitätschromatographie mittels HPLC.

| Abschnitt | Schritt | Lösung | Säulen- volumen [-] | Flussrate [mL/min] |
|------------------------|----------------------------|--------------------|------------------------|-----------------------|
| Vorbereitung der Säule | Auswaschen der Lagerlösung | ddH ₂ O | 5 | 10 |
| | Beladung der Säule | 0,1 M Nickelsulfat | 5 | 10 |
| | Auswaschen des Nickels | ddH ₂ O | 10 | 10 |
| | Äquilibrieren | Bindepuffer | 5 | 5 |
| Aufreinigung | Auftrag | Probe | ~8 | 5 |
| | Waschen | Bindepuffer | 10 | 10 |
| | Elution | Elutionspuffer | 10 | 10 |
| Regeneration der Säule | Waschen | ddH ₂ O | 5 | 10 |
| | Regenerieren | Regenerierlösung | 10 | 10 |
| | Entfernen von EDTA | 0,5 M NaCl | 10 | 10 |
| | Lagerung | 20 % Ethanol | 10 | 10 |

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung von essentiellen Elementen des Expressionssystems

3.1.1 Wachstumsverhalten des Wildtyps und Identifizierung des Carrierproteins

In dieser Arbeit sollen mit *Neurospora crassa* Antikörperfragmente in Form eines Fusionsproteins mit einem *Carrier*-Protein produziert werden. Als *Carrier*-Protein wurde das Enzym Glucoamylase (GLA-1) ausgewählt, welches *N. crassa* bei Wachstum auf Stärke und Stärkeabbauprodukten sekretiert (Koh-Luar *et al.*, 1989). Zunächst musste überprüft werden, unter welchen Bedingungen die Glucoamylase in signifikanten Mengen sekretiert wird. Dazu wurde der Wildtyp (*mat A*, FGSC 2489) in Schüttelkolben submers in Minimalmedium mit Glucose (Abb. 3.1) bei 30 °C kultiviert. Bereits zu Beginn dieser Arbeit sollte getestet werden, ob sich das Wachstum in Kolben mit und ohne Schikane unterscheidet. Durch die unterschiedlichen Verhältnisse an Turbulenzen im Kolben könnte sich das Sekretions- und Wachstumsverhalten ändern (Unterschied im Sauerstoffeintrag). Für die Kultivierung wurden parallel mehrere Kolben unter identischen Bedingungen kultiviert und zu jedem Probenahmezeitpunkt ein Kolben vollständig geerntet. Die Biomasse wurde vom Kulturüberstand abgetrennt und die Biotrockenmasse (BTM) sowie der pH-Wert der Kultur gemessen. Die Proteine im Kulturüberstand wurden gefällt und auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Des Weiteren wurde überprüft, zu welchem Zeitpunkt die Glucose verbraucht war, da dies ein Anzeichen ist, dass der Kultur keine Kohlenstoffquelle mehr zur Verfügung steht und sie abstirbt. Dazu wurde in den Überständen mittels colorimetrischem Test auf Basis von o-Dianisidin die Glucosekonzentration gemessen (Abb. 3.1 D).

Zusätzlich sollte überprüft werden, ob *N. crassa* unter diesen Kultivierungsbedingungen bereits Proteasen sekretiert, die später das heterologe Produkt abbauen könnten. Dazu wurde zunächst mittels eines *Escherichia coli*-Expressionssystems der Modellantikörper HT186-D11 produziert und aufgereinigt (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde eine definierte Menge des aufgereinigten scFv für 24 h bei 30 °C mit den Überständen aus der vorangegangenen Kultivierung inkubiert. Nach Auftrennung auf einem Polyacrylamidgel wurde analysiert, ob Abbauprodukte entstanden sind oder der Antikörper komplett abgebaut wurde (Abb. 3.1 F). Es wird bei diesem Assay die Annahme getroffen, dass in *E. coli* produzierte scFv eine ähnliche Sensitivität gegenüber Abbau durch Proteasen aufweisen wie in *N. crassa* produzierte scFv. Die Analyse der Nebenbanden ist daher entscheidend.

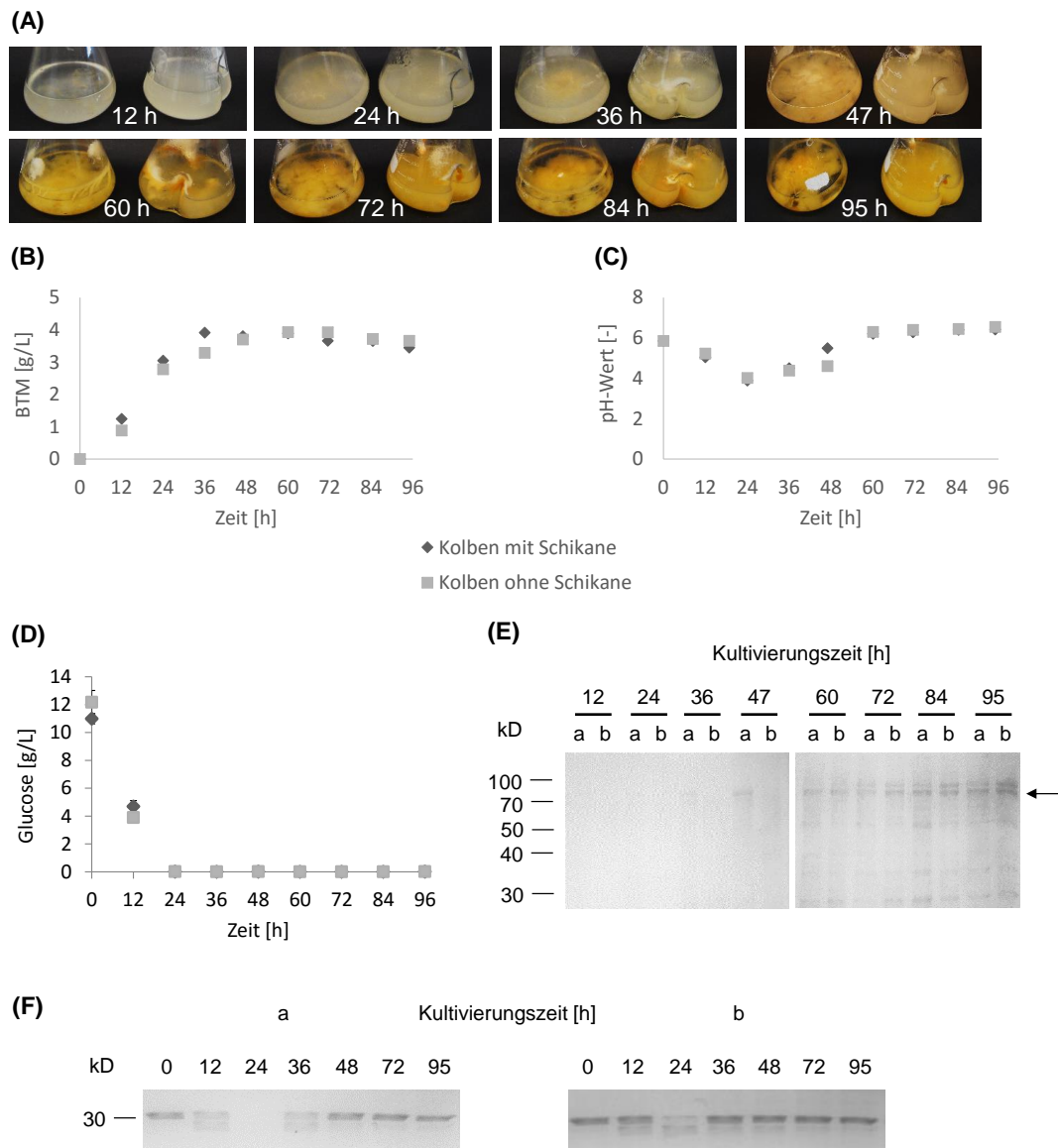


Abb. 3.1: Wachstums- und Sekretionscharakterisierung bei Submerskultivierung des Wildtyps in Minimalmedium mit Glucose. Kultiviert wurde für maximal 95 h in Minimalmedium mit Glucose (10 g/L) bei 30 °C. Für jeden Zeitpunkt wurde ein separater Kolben angeimpft (A). Die Biotrockenmasse der Kultur (B), der pH-Verlauf (C) und die Glucosekonzentration (D) wurden gemessen. Diese wurde in einem colorimetrischen Test mit o-Dianisidin mit einem Standard verglichen. Jede Messung wurde dreimal wiederholt. Die Proteine im Überstand wurden gefällt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und über Coomassie-Färbung (E) analysiert. Es wurden gefällte Proteine (Faktor 30) aus Kulturen, welche in Kolben mit (a) und ohne Schikane (b) kultiviert wurden, analysiert. Der Pfeil markiert die Proteinbande, bei welcher die Glucoamylase vermutet wird. Zusätzlich wurde die Proteaseaktivität (F) in den Überständen überprüft. Kulturüberstände wurden mit scFv (produziert in *E. coli*, HT186-D11, 1 µg) für 24 h bei 30 °C inkubiert. Als Kontrolle wurde der scFv mit Medium (0) inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Ein Fehlen der Bande bei 30 kD weist auf eine Proteaseaktivität hin, welche spezifisch für den eingesetzten scFv ist.

Bei beiden Kolbenarten entstand eine Kultur mit freiem Myzel, welches bei Kolben mit Schikane wesentlich homogener verteilt war. Unabhängig von der Kolbenform waren alle Kulturen zunächst weißlich und färbten sich mit der Zeit gelblich-orange. Die Biomasse stieg bis zu 36 h an, während der pH-Wert des Mediums zunächst absank und anschließend wieder anstieg. Auf den Polyacrylamidgelen sind bei ca. 70 kD Proteine zu erkennen, was dem Molekulargewicht von GLA-1 (69 kD) entspricht (Koh-Luar *et al.*, 1989). In der Masterarbeit von Felicitas Vernen konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesem Protein tatsächlich um GLA-1 handelt (Vernen, 2013). Dort wurde ein Stamm kultiviert, bei welchem das Glucoamylasegen deletiert war. Der Überstand dieser Kultur wies im Gegensatz zum Wildtyp das 70 kD-Protein nicht mehr auf (Daten nicht gezeigt).

Die Glucose war unabhängig vom Kolbentyp bereits nach 24 h vollständig verbraucht. Die in Abb. 3.1 E nachgewiesenen Proteine gelangten somit erst in der vermuteten Absterbephase in das Kulturmedium. Die Verwendung der unterschiedlichen Kolbenformen führte zu keinen signifikanten Unterschieden bei den Wachstumsparametern und der Sekretion.

Der Protease-Assay zeigte eindeutig, dass bereits nach 12 h eine Proteaseaktivität vorhanden war, welche zum Abbau von HT186-D11 führte. Diese war nach 24 h am stärksten und schwächte sich danach wieder ab. Bei Kolben ohne Schikane wurde der scFv zu einem höheren Grad abgebaut. Es konnte also eindeutig gezeigt werden, dass auch *N. crassa* Proteasen sekretiert, welche das zukünftige Produkt abbauen. Daher musste ein Stamm entwickelt werden, welcher keine Proteaseaktivität mehr aufweist.

Nach der Kultivierung auf Glucose sollte die Kultivierung auf Maltose wiederholt werden. Unter diesen Bedingungen wurde eine gesteigerte Sekretion der Glucoamylase erwartet (Koh-Luar *et al.*, 1989). Dies sollte Rückschlüsse über den nativen Glucoamylase-Promotor *Pgla* ermöglichen, der im späteren Expressionssystem eingesetzt werden sollte. Zusätzlich sollte wieder überprüft werden, ob auch unter diesen Bedingungen Proteasen in das Kulturmedium freigesetzt werden. Für die Charakterisierung des Wachstums und der Sekretion wurden ebenfalls wieder die Biotrockenmasse und der pH-Wert bestimmt sowie der Kulturüberstand mittels SDS-PAGE analysiert. Dieser wurde ebenfalls auf seine Proteaseaktivität überprüft. Die Kultivierung wurde in beiden Kolbenformen je zweimal durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen. Die SDS-PAGE-Analysen sind jedoch nur für die zweite Kultivierung aufgeführt, da für beide Kultivierungen identische Ergebnisse erhalten wurden (Abb. 3.2).

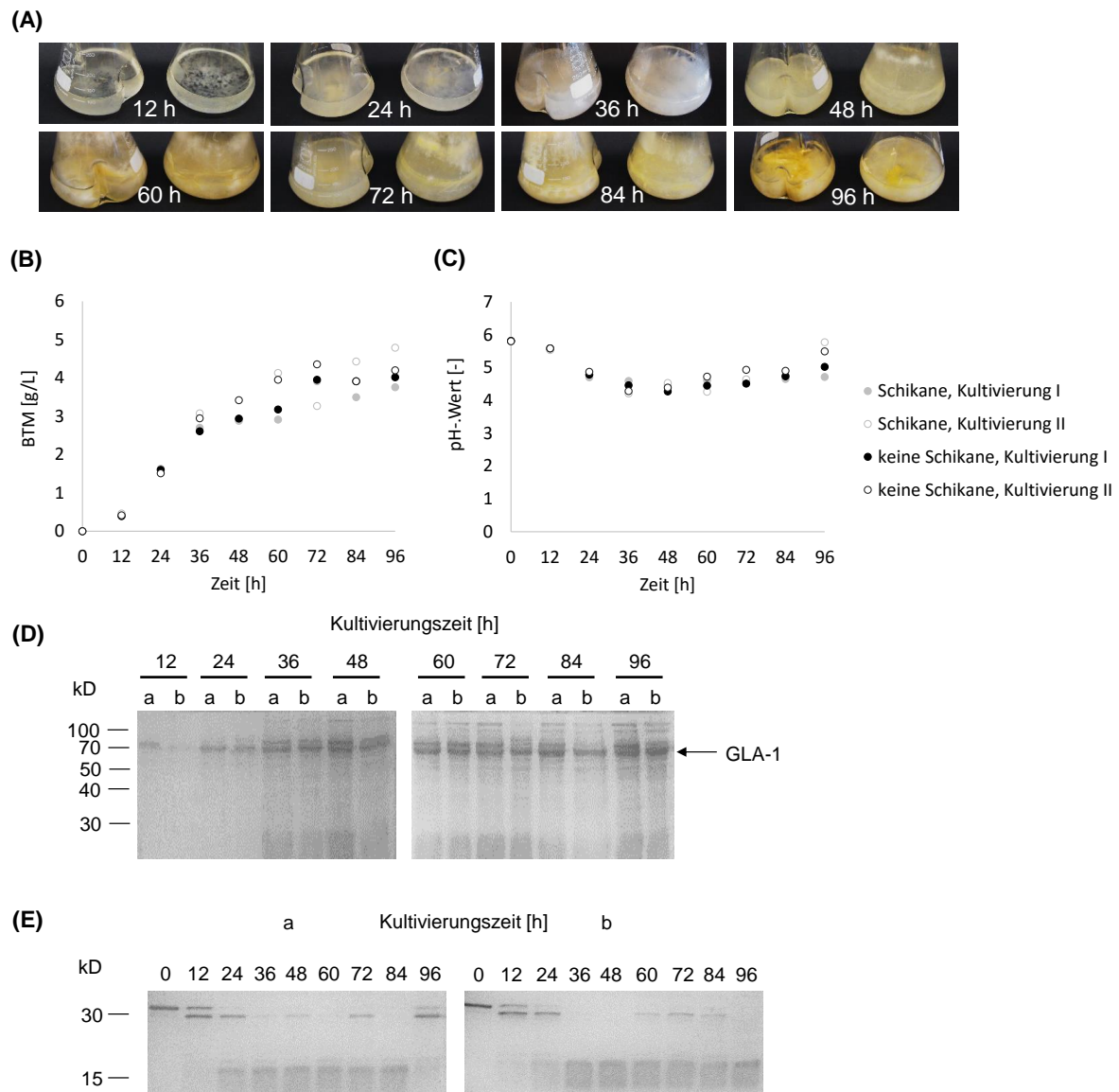


Abb. 3.2: Wachstums- und Sekretionscharakterisierung bei Submerskultivierung des Wildtyps in Minimalmedium mit Maltose. Kultiviert wurde für maximal 96 h in Minimalmedium mit Maltose bei 30 °C. Für jeden Zeitpunkt wurde ein separater Kolben angeimpft (A). Die Kultivierung wurde zweimal in zwei unterschiedlichen Zeiträumen (Kultivierung I und II) durchgeführt. Die Biotrockenmasse der Kultur (B) sowie der pH-Verlauf (C) wurden gemessen. Die Proteine im Überstand wurden gefällt (Faktor 30), mittels SDS-PAGE aufgetrennt und über Coomassie-Färbung (D) analysiert. Es wurden gefällte Proteine aus Kulturen, welche in Kolben mit (a) und ohne Schikane (b) kultiviert wurden, analysiert. Der Pfeil markiert die GLA-1-Bande. Zusätzlich wurde die Proteaseaktivität (E) in den Überständen überprüft. Die Überstände wurden mit scFv (produziert in *E. coli*, HT186-D11, 1 µg) für 24 h bei 30 °C inkubiert und auf einem Polyacrylamidgel mit anschließender Coomassie-Färbung aufgetrennt. Ein Fehlen der Bande bei 30 kD weist auf eine Proteaseaktivität hin.

Bei Wachstum auf Maltose sahen die Kulturen nach 12 h flockiger aus als bei der Kultivierung auf Glucose (vgl. Abb. 3.1). Abgesehen hiervon zeigten die Kulturen von Maltose und Glucose das gleiche Erscheinungsbild. Die Verläufe der Biotrockenmasse und des pH-Wertes bei Wachstum auf Maltose ähneln jenen bei Wachstum auf Glucose. An der doppelten Kultivierung ist gut zu sehen, dass die Biomassewerte abhängig von der Kultivierung schwanken können. Ein wesentlicher Unterschied zwischen der Kultivierung auf Maltose und Glucose ist, dass auf Maltose wesentlich größere Mengen an Protein ins Medium abgegeben wurden, unter anderem ein Protein der Größe von GLA-1 (Abb. 3.2 D). Gleichzeitig war die Proteaseaktivität wesentlich höher (Abb. 3.2 E) und führte dazu, dass im Assay HT186-D11 bereits durch Überstand, der nach 12 h geerntet wurde, zu einem Großteil abgebaut wurde. Durch die verschiedenen Kultivierungen wurde in Verbindung mit den Ergebnissen aus der Masterarbeit von Felicitas Vernen nachgewiesen, dass GLA-1 das dominante Protein im Kulturüberstand ist und es sich somit als *Carrier*-Protein eignet. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass ein entscheidender Schritt bei der Erzeugung des Expressionssystems die Beseitigung der Proteaseaktivität darstellt.

3.1.2 Identifizierung eines proteasedefizienten Stammes

Mit dem Deletionsstamm $\Delta vib-1$ wurde in *N. crassa* bereits ein proteasedefizienter Stamm identifiziert (Dementhon *et al.*, 2006). Zunächst sollte dieser Stamm makroskopisch charakterisiert werden und überprüft werden, inwiefern unter den vorher bestimmten Kultivierungsbedingungen die Proteaseaktivität minimiert oder beseitigt ist. Für die Charakterisierung wurde das Wachstum auf Festmedium und in Flüssigmedium untersucht. Der Fokus lag dabei auf der Überprüfung der Proteaseaktivität. Hierfür wurde ein Protease-Assay durchgeführt, zusätzlich wurden die Überstände der Kulturen gefällt und mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 3.3). Es wurden zwei Kultivierungen durchgeführt, die Untersuchung der Proteaseaktivität ist jedoch nur für die zweite Kultivierung aufgeführt (Ergebnisse waren identisch).

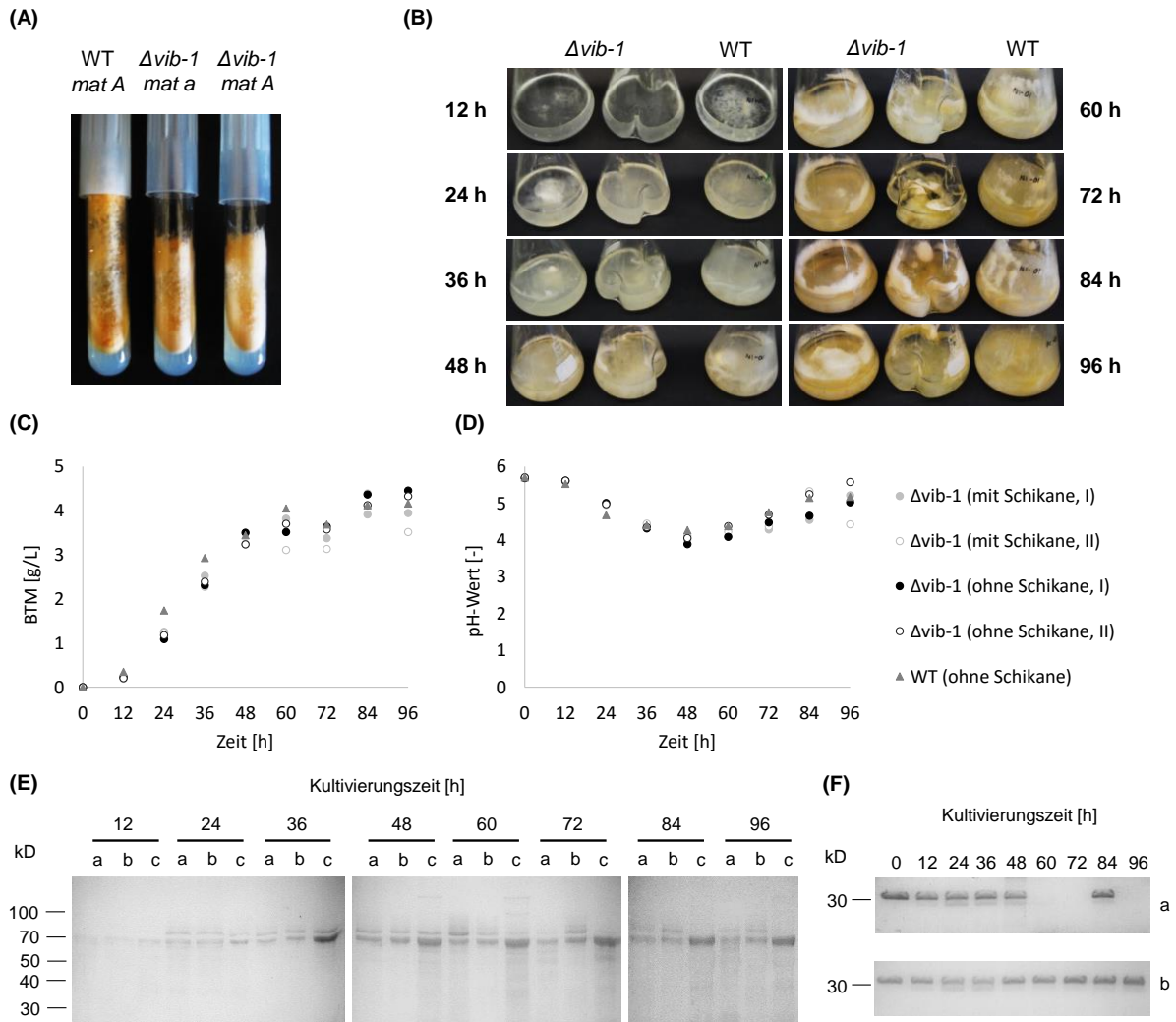


Abb. 3.3: Charakterisierung des Deletionsstammes $\Delta vib-1$ bei Wachstum auf Festmedium (A) und in submerser Kultur (B). Die submerser Kultivierung erfolgte in Minimalmedium mit Maltose bei 30 °C. Für jeden Zeitpunkt wurde ein separater Kolben angeimpft. Die Kultivierung wurde zweimal in Kolben mit und ohne Schikane durchgeführt. Bei der zweiten Kultivierung wurde der Wildtyp (WT) in Kolben ohne Schikane als Wachstumskontrolle kultiviert. Die Biotrockenmasse der Kultur (C) sowie der pH-Verlauf (D) wurden über einen Zeitraum von 96 h gemessen. Die römischen Zahlen zeigen an, ob es sich um die erste Kultivierung (I) oder die Wiederholung (II) handelt. Die Proteine im Überstand wurden gefällt (Faktor 30), mittels SDS-PAGE aufgetrennt und über Coomassie-Färbung (E) analysiert. Es wurden gefällte Proteine aus Kulturen, welche in Kolben mit (a) und ohne Schikane (b) kultiviert wurden, analysiert. Zeitgleich wurden Überstände einer Wildtypkultur analysiert (c, keine Schikane). Der Pfeil markiert die GLA-1-Bande. Zusätzlich wurde die Proteaseaktivität (F) in den Überständen überprüft. Die Überstände wurden mit scFv (produziert in *E. coli*, HT186-D11, 1 µg) für 24 h bei 30 °C inkubiert und auf einem Polyacrylamidgel mit anschließender Coomassie-Färbung aufgetrennt. Ein Fehlen der Bande bei 30 kD weist auf eine Proteaseaktivität hin.

Auf Festmedium (Abb. 3.3 A) bildete $\Delta vib-1$ Lufthyphen mit geringerer Höhe als der Wildtyp und die Sporenfarbe war gelblich im Gegensatz zum stark orange-gefärbten Wildtyp. Bei submerser Kultivierung zeigte $\Delta vib-1$ wildtypisches Wachstum und bildete keinen besonderen makroskopischen Phänotyp aus (Abb. 3.3 B). In Kolben ohne Schikane wies $\Delta vib-1$ nahezu keinerlei Proteaseaktivität mehr auf (Abb. 3.3 F), Nebenprodukte waren kaum noch zu erkennen. Im Schikanekolben kam es zwar noch zu Proteaseaktivität, diese stellte sich allerdings erst nach 60 h ein. Es wird angenommen, dass die Kultur zu diesem Zeitpunkt das Substrat komplett verbraucht hatte (basierend auf den Glucoseabbau-Daten in Abschnitt 3.1.1) und es sich um intrazelluläre Proteasen handelte, die bei der Autolyse freigesetzt wurden. Unabhängig vom Kolbentyp sekretierte der Deletionsstamm wesentlich geringere Proteinmengen als der Wildtyp (Abb. 3.3 E).

Da der Protease-Assay für beide Kultivierungen identische Ergebnisse hervorgebracht hatte (erste Kultivierung nicht gezeigt), wurde davon ausgegangen, dass mit $\Delta vib-1$ ein Stamm ohne Proteaseaktivität zur Verfügung stand. In zukünftigen Produktionsstämmen wurde daher das *vib-1*-Gen deletiert. Gleichzeitig führt diese Deletion allerdings zu geringeren Konzentrationen an GLA-1 im Überstand und somit möglicherweise zu einer niedrigeren Ausbeute an Produkt in späteren Produktionsstämmen.

3.1.3 Hypersekretion der Glucoamylase durch *exo-1*-Mutation

Ein Ziel bei der Erzeugung eines *N. crassa*-Expressionssystems war die Maximierung der Ausbeute an heterologem Protein. Dies sollte unter anderem durch eine Steigerung der Sekretion der Glucoamylase als zukünftigem *Carrier*-Protein erreicht werden.

In der Literatur wird von einem Stamm berichtet, welcher aufgrund der *exo-1*-Mutation größere Mengen an Glucoamylase sekretiert als der Wildtyp (Gratzner, 1972). Dieser Stamm weist eine andere Zusammensetzung der Zuckermoleküle in der Zellwand auf und verhindert so womöglich die Adsorption der Glucoamylase an die Zellwand, wodurch der Kulturüberstand erhöhte GLA-1-Konzentrationen aufweist. In diesem Abschnitt sollte herausgefunden werden, ob unter den hier definierten Bedingungen die Hypersekretion von GLA-1 bestätigt werden kann. Dazu wurde der *exo-1*-Stamm auf Fest- und in Flüssigmedium kultiviert und auf erhöhte Sekretion hin überprüft (Abb. 3.4).

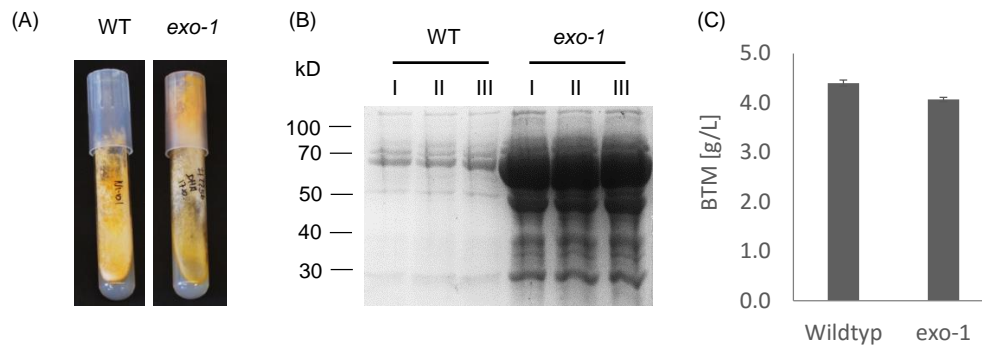


Abb. 3.4: Charakterisierung von *exo-1*-Stämmen. Das Wachstum auf Festmedium wurde mit dem Wildtyp (WT) verglichen (A). Beide Stämme wurden in flüssigem Minimalmedium mit Maltose (10 g/L) für 3 Tage bei 25 °C in Dreifachansätzen kultiviert. Die Überstände wurden gefällt (Faktor 30), auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie-Färbung analysiert (B). Die römischen Ziffern zeigen die Nummer des verwendeten Schüttelkolbens auf. Die Biotrockenmasse aller Kulturen wurde bestimmt (C).

Auf Festmedium ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und *exo-1*-Stamm erkennen, allerdings schien *exo-1* etwas längere Lufthyphen zu haben als der Wildtyp (Abb. 3.4 A). Die stark gesteigerte Sekretion von GLA-1 (Bande auf Höhe von ca. 70 kD) sowie anderer Proteine (Abb. 3.4 B) konnte bestätigt werden. Die Biomasse des *exo-1*-Stammes war etwas geringer als die des Wildtyps (Abb. 3.4 C). Bei der Filtration der Kulturen zur Bestimmung der Biomasse fiel auf, dass die *exo-1*-Kulturen wesentlich homogener waren als Wildtyp-Kulturen.

Durch die stark gesteigerte Sekretion des potentiellen *Carrier*-Proteins GLA-1 könnte das Einbringen dieser Mutation in den Produktionsstamm den Ertrag deutlich erhöhen und wurde daher in der Strategie für die folgende Stammentwicklung berücksichtigt.

3.2 Produktion von Antikörperperfusionsproteinen basierend auf der vollständigen Glucoamylase als *Carrier*

3.2.1 Aufbau des Expressionssystems

Ziel dieses Expressionssystems war es, die zwei verschiedene Modellantikörper HT186-D11 und D1.3 zu produzieren. Bei diesen Antikörpern handelt es sich um scFv, also Antikörperfragmente mit einem Molekulargewicht von ca. 30 kD (31 kD bei HT186-D11 und 28 kD bei D1.3). Durch die Auswahl der zwei Modellantikörper sollte sichergestellt werden, dass falls ein scFv aufgrund seiner spezifischen Eigenschaften nicht produziert werden kann, das System auf Basis des anderen scFv dennoch entwickelt werden kann. Für die erfolgreiche Sekretion sollten die scFv mit ihrem N-Terminus an die Glucoamylase fusioniert werden. Die Glucoamylase besteht aus einer katalytischen Domäne, einem Linker und einer

stärkebindenden Domäne (Stone *et al.*, 1993). Um *Carrier* und scFv räumlich voneinander zu trennen (z. B. für eine bessere Faltung), wurde ein flexibler Linker, bestehend aus der repetitiven Sequenz (GGGS)₃ aus den Aminosäuren Glycin und Serin (Chen *et al.*, 2013), zwischen die Proteinabschnitte eingebaut (Abb. 3.5).

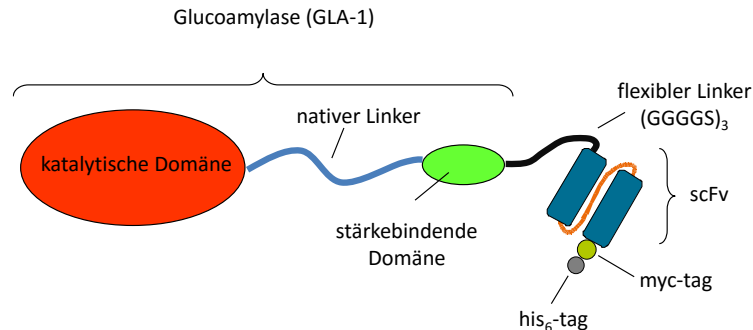


Abb. 3.5: Schematische Darstellung des Fusionsproteins für die Produktion von scFv. An den C-Terminus der stärkebindenden Domäne wurde getrennt durch einen flexiblen Linker der scFv fusioniert. Das Fusionsprotein ist C-terminal markiert mit einem *myc-tag* und einem *his₆-tag*.

In *N. crassa* kann DNA über homologe Rekombination stabil an nahezu jeden Locus integriert werden (Ninomiya *et al.*, 2004). Für diese Arbeit wurde zunächst der native Glucoamylase-Locus ausgewählt. Durch die Integration an diesem Locus sollen die hohen Sekretionslevel der Glucoamylase bei Kultivierung auf Stärkeabbau-Produkten ausgenutzt werden. Ein möglicher Grund für diese hohen Sekretionslevel könnte eine vorteilhafte epigenetische Regulation des Locus durch Eu- und Heterochromatin sein (Shwab & Keller, 2008). Nach der Integration des Expressionskassette (Abb. 3.6) wird das Gen des Fusionsproteins vom Glucoamylase-Promotor *Pgla* und dem Terminator *Tgla* flankiert. Dadurch wird das Glucoamylasegen durch das Gen des Fusionsproteins ersetzt und es wird keine native Glucoamylase mehr gebildet.

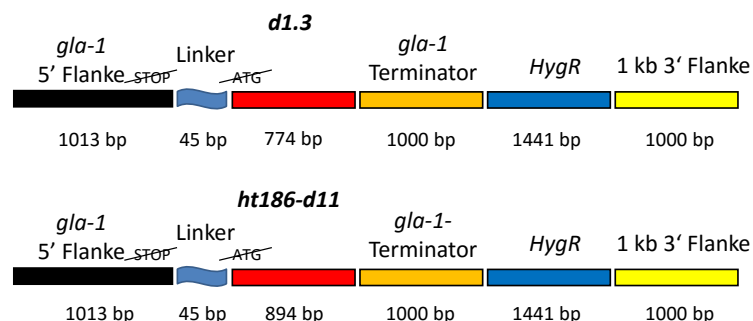


Abb. 3.6: Schematische Darstellung der genetischen Elemente der Expressionskassette für die Integration am nativen *gla-1*-Locus. Die Integrationskassette für den nativen *gla-1*-Locus enthält unter anderem eine 1 kb lange 5' Flanke, welche die letzten 1000 bp des *gla-1*-Gens darstellt, den Glucoamylase-Terminator, das Hygromycinresistenzgen (*HygR*) sowie eine 1 kb lange 3' Flanke für die Integration an den korrekten Locus. Für die Erzeugung eines durchgehenden offenen Leserasters wurde in *gla-1*-Gen das Stoppcodon deletiert. Das scFv-Gen enthält kein Startcodon mehr.

Die Expressionskassetten wurden mittels *Yeast Recombinational Cloning* hergestellt, in einen Transformationsvektor umklont und sequenziert (siehe Material und Methoden). Vorher wurden das scFv-Gen an die *Codon usage* von *N. crassa* angepasst. Anschließend wurde der Stamm N1-08 ($\Delta mus-51::bar^+$) transformiert. Die Transformanten wurden mittels PCR auf Vorhandensein der vollständigen Expressionskassette überprüft und durch Einzelsporisolierung in Homokaryen umgewandelt (siehe Anhang). Zusätzlich wurden Produktionsstämme erzeugt, bei denen das *vib-1*-Gen deletiert ist, wodurch sie keine Proteasen mehr sekretieren sollten. Hierfür wurde durch Kreuzung die Deletion des *vib-1*-Gens in den potentiellen Produktionsstamm DHN-063 (*gla-1::gla-1-ht186-d11-Tgla-hph*, $\Delta mus-51::bar^+$) eingebracht und der Stamm mittels PCR bestätigt (siehe Anhang). Im gleichen Schritt konnte zusätzlich die Entfernung der *mus-51*-Deletion erfolgen, welche in den Stämmen nicht erwünscht war und lediglich für die Integration der Fremd-DNA benötigt wurde. Im nächsten Schritt sollten Produktionsstämme mit und ohne $\Delta vib-1$ auf die Produktion des heterologen Fusionsproteins überprüft werden.

3.2.2 Expression von GLA-1-HT186-D11 am nativen Locus mit $\Delta vib-1$ -Hintergrund

Zunächst sollte analysiert werden, ob die erzeugten Stämme das heterologe Protein produzieren und sekretieren. Hierfür wurde ein Nachweis des Produktes in der biomasseassoziierten Fraktion und im Kulturüberstand durchgeführt. Leider konnte der scFv D1.3 unter keinen der untersuchten Bedingungen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sind eine Bestätigung für die gewählte Strategie, mit dem Expressionssystem zwei verschiedene Modellantikörper zu produzieren und in Folge dessen wurde das Expressionssystem nur noch auf Grundlage der Produktion von HT186-D11 untersucht.

Zur Überprüfung der Produktion von HT186-D11 wurden zwei Stämme (DHN-073 und DHN-074) mit GLA-1-HT186-D11 mit $\Delta mus-51$ (*gla-1::gla-1-ht186-d11-Tgla-hph*, $\Delta mus-51::bar^+$, $\Delta vib-1$) und zwei entsprechende Stämme mit *mus-51*⁺ (DHN-075 und DHN-076) in Minimalmedium mit Maltose kultiviert und die Proteinproduktion analysiert. Als Kontrollen wurden der Stamm $\Delta vib-1$ sowie der Empfängerstamm N1-08 ($\Delta mus-51$) verwendet (Abb. 3.7).

Das Fusionsprotein GLA-1-HT186-D11 konnte biomasseassoziiert eindeutig detektiert werden (Abb. 3.7, Pfeil). Es hat ein berechnetes Molekulargewicht von ca. 95 kD, dies wurde im Western Blot bestätigt. Nach 24 h war das Signal für die Stämme mit $\Delta vib-1$ -Hintergrund

(Abb. 3.7, a-d) stärker als beim entsprechenden *vib-1*⁺-Stamm (e). Nach 48 h war die biomasseassoziierte Menge an Fusionsprotein bei Stämmen mit und ohne $\Delta vib-1$ ungefähr gleich. Wie erwartet, hatte die *mus-1*-Deletion keine Auswirkung auf die Produktion. Extrazellulär gelang unabhängig von $\Delta vib-1$ allerdings kein Nachweis des Fusionsproteins, obwohl die neu generierten Stämme keine Proteasen mehr sekretieren sollten. Es besteht daher die Möglichkeit, dass ein anderer Grund für die fehlende Sekretion des Produktes vorlag.

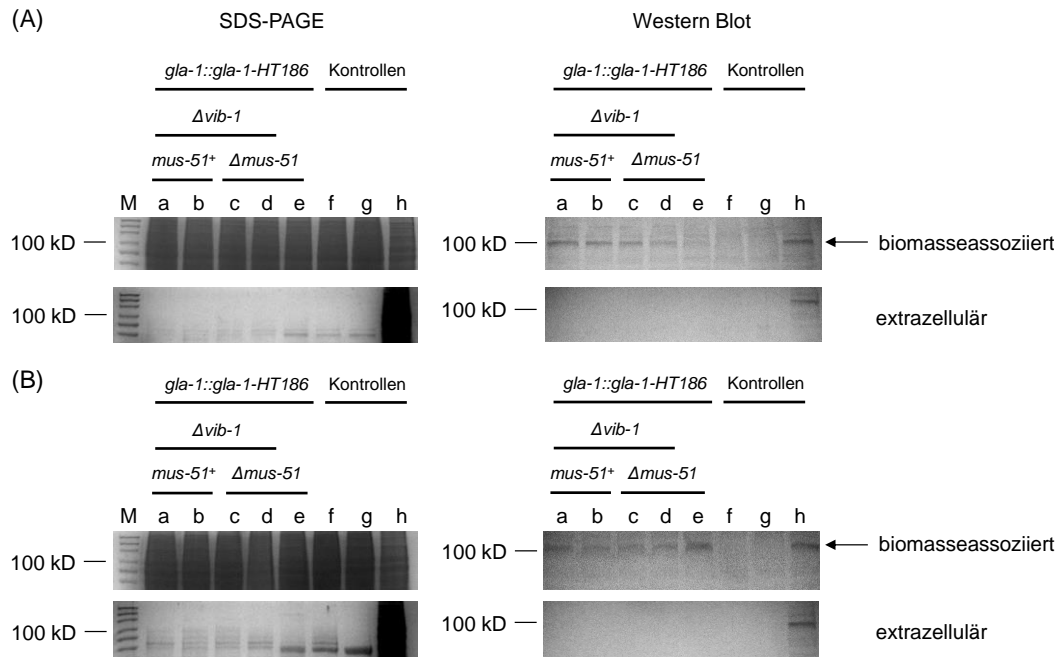


Abb. 3.7: Das heterologe Fusionsprotein wurde produziert, konnte jedoch nicht im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Die Biomasse wurde aufgeschlossen und die biomasseassoziierten Proteine isoliert. Pro Bahn wurde 1 µg Gesamtprotein aufgetragen. Proteine aus dem Kulturüberstand wurden gefällt (Faktor 30). Beide Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und über Coomassie-Färbung analysiert. In einem Western Blot wurde der *myc-tag* des Fusionsproteins detektiert. Untersucht wurden Stämme, welche in Minimalmedium mit Maltose kultiviert und nach 24 h (A) und 48 h (B) geerntet wurden. Insgesamt wurden vier Produktionsstämme mit $\Delta vib-1$ -Hintergrund kultiviert (a-d) und ein Produktionsstamm mit *vib-1*⁺ (e). Bei den proteasedefizienten Stämmen wurden zwei Stämme mit dem *mus-1*-Gen (a, b) und zwei Stämme mit $\Delta mus-51$ (c, d) überprüft. Als Kontrolle wurden die Stämme $\Delta vib-1$ (f) und der ursprüngliche Empfängerstamm N1-08 ($\Delta mus-51$) (g) verwendet. Die technische Positivkontrolle (h) enthält das Fusionsprotein GLA-1-HT186-D11 und stammt aus einer vorangegangenen Kultivierung. Der Pfeil markiert die Laufhöhe des Fusionsproteins. Die Entwicklung des Western Blots erfolgte mittels Anfärbung der Membran mit NBT/BCIP-System. Folgende Produktionsstämme wurden kultiviert: (a) DHN-075 (*gla-1::gla-1-ht186-d11-Tgla-hph*, $\Delta vib-1$), (b) DHN-076 (*gla-1::gla-1-ht186-d11-Tgla-hph*, $\Delta vib-1$), (c) DHN-073 (*gla-1::gla-1-ht186-d11-Tgla-hph*, $\Delta mus-51::bar^+$, $\Delta vib-1$), (d) DHN-074 (*gla-1::gla-1-ht186-d11-Tgla-hph*, $\Delta mus-51::bar^+$, $\Delta vib-1$) und (e) DHN-063 (*gla-1::gla-1-ht186-d11-Tgla-hph*, $\Delta mus-51::bar^+$).

Anhand der sekretierten Proteine lässt sich feststellen, dass die Integration der Expressionskassette am nativen Genlocus erfolgreich war, da die charakteristische Bande der Glucoamylase bei ca. 70 kD bei Stämmen mit $\Delta vib-1$ nicht mehr vorhanden ist (im Vergleich zur Kontrolle N1-08). Dies ist dadurch zu erklären, dass nun am *gla-1*-Locus ein Gen integriert ist, welches ein Protein mit 95 kD kodiert. Dadurch wurden PCR-Analysen bestätigt, welche

für die Verifizierung von generierten Stämmen durchgeführt wurden (siehe Anhang). Betrachtet man die Menge an Gesamtprotein im Überstand so ist zu erkennen, dass die Produktionsstämme mit $\Delta vib-I$ -Hintergrund (a-d) wesentlich geringere Gesamtprotein-konzentrationen erreichten als der Stamm mit *vib-I*-Gen. (e-g). Dieses Gen wirkte sich also auf die Gesamtmenge der sekretierten Proteine aus.

Obwohl intrazellulär der Nachweis des Fusionsproteins gelungen ist, ist nicht bekannt, ob das Protein korrekt gefaltet ist, da der Western Blot unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt wurde und das Produkt daher in linearer Form vorlag. Eine unkorrekte Faltung kann daher nicht ausgeschlossen werden, welche wiederum zum Abbau des Produktes führen würde, bevor es sekretiert wäre (Su *et al.*, 2012). Es gibt zahlreiche Gründe, die zu der unkorrekten Faltung führen könnten. Einer dieser Gründe könnte der Aufbau des Fusionsproteins mit den beiden Linkern sein. Ein anderer Grund basiert auf der zu Beginn dieser Arbeit durchgeführten Codon-Optimierung auf die *Codon usage* von *N. crassa*. Hierbei kann zwar rein rechnerisch die optimale Codonverteilung vorliegen, aus biologischer Sicht kann dies allerdings dazu führen, dass bei der Translation das Peptid zu schnell synthetisiert wird und daher eine Zwischenfaltung verhindert wird. Diese könnte jedoch essentiell für eine korrekte Faltung sein.

3.2.3 Kultivierung bei verminderter Temperatur

Eine Möglichkeit des Umgehens des *Codon usage*-Problems ist die Kultivierung bei niedrigen Temperaturen (Zhou *et al.*, 2013). Zusätzlich ist dies in der Biotechnologie ein etablierter Ansatz zur Produktsteigerung (Schein, 1989). Durch die Absenkung der Kultivierungstemperatur werden alle biochemischen Abläufe verlangsamt und eine Überlastung der Zelle durch die Verarbeitung von neu synthetisiertem heterologen Protein verhindert. Die Kultivierung bei einer niedrigen Temperatur sollte daher auch an dieser Stelle versucht werden. Hierfür wurden Produktionsstämme (DHN-063 und DHN-075) für 7 Tage bei 15 °C kultiviert (Abb. 3.8).

GLA-1-HT186 wurde in beiden getesteten Stämmen biomasseassoziiert nachgewiesen (Abb. 3.8 A, a und b). Dabei scheint die Menge an Fusionsprotein mit der Kultivierungszeit abgenommen zu haben. Zum ersten Mal in dieser Arbeit konnte das Produkt GLA-1-HT186-D11 im Kulturüberstand nachgewiesen werden (B, 7d, Bahn b). Das Signal war zwar sehr schwach, jedoch eindeutig. Bei diesem Stamm (DHN-075) handelt es sich um den proteasedefizienten Produktionsstamm mit $\Delta vib-I$ -Hintergrund. Beim nicht

proteasedefizienten GLA-1-HT186-D11 produzierenden Stamm (DHN-063, *vib-1*⁺, a) konnte extrazellulär kein Nachweis erbracht werden. Dieses Ergebnis zeigt auf, dass die Beseitigung der Proteaseaktivität das Schlüsselement dieser Arbeit ist, da das Produkt sonst wahrscheinlich unmittelbar nach der Sekretion abgebaut wird.

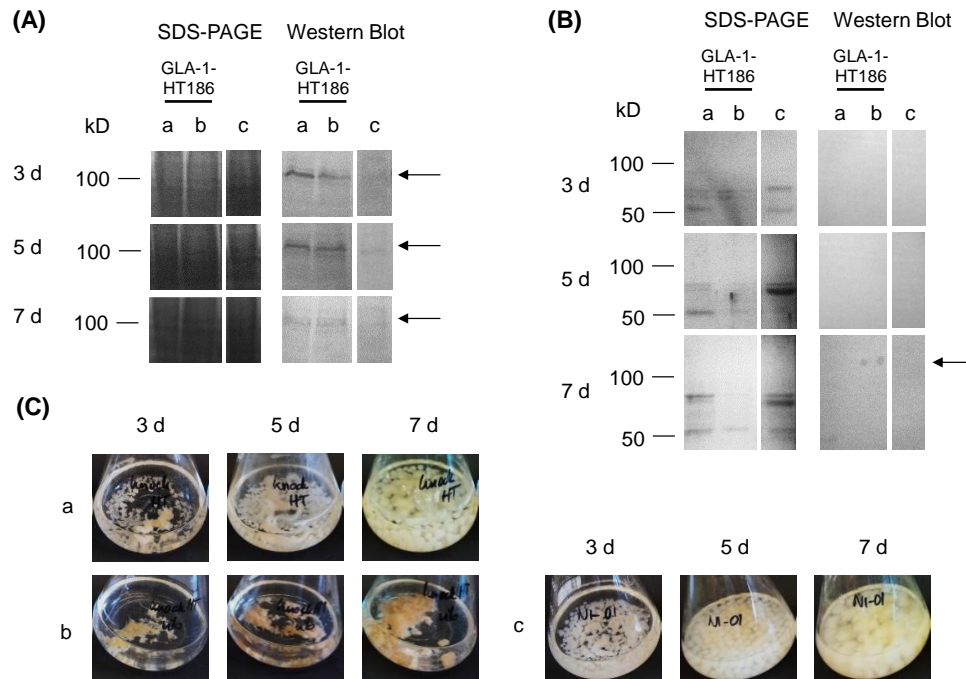


Abb. 3.8: Erster extrazellulärer Nachweis des Fusionsproteins GLA-1-HT186-D11 bei einem proteasedefizienten Stamm bei Kultivierung in Minimalmedium mit Maltose bei 15 °C. Untersucht wurde die biomasseassoziierte Fraktion (A) und die extrazelluläre Fraktion (B) der Kulturen. Der makroskopische Phänotyp der Kulturen zeigte pelletartiges Wachstum auf (C). Die Kultivierung wurde nach 3 bis 7 Tagen abgebrochen. Die Biomasse wurde aufgeschlossen und die biomasseassoziierten Proteine isoliert. Pro Bahn wurde 1 µg Gesamtprotein aufgetragen. Proteine aus dem Kulturüberstand wurden gefällt. Beide Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und über Coomassie-Färbung analysiert. In einem Western Blot wurde der *myc-tag* des Fusionsproteins detektiert. Folgende Stämme wurden kultiviert: (a) DHN-063 (*gla-1::gla-1-ht186-d11, Δmus-51*), (b) DHN-075 (*gla-1::gla-1-ht186-d11, Δvib-1*) und (c) Wildtyp (N1-01). Der Pfeil markiert die Laufhöhe des Fusionsproteins. Die Entwicklung des Western Blots erfolgte mittels Anfärbung der Membran mit NBT/BCIP-System.

An den Bandenintensitäten der extrazellulären Proteine (Abb. 3.8 B) ist zu erkennen, dass auch die Sekretion stark verlangsamt war, da erst ab 5 Tagen die Maximalmenge an Protein erreicht ist. Nur die Kombination aus langsamen Wachstum bei niedriger Temperatur und der Beseitigung der Proteaseaktivität durch den *Δvib-1*-Hintergrund hat zum Erfolg in der Sekretion des Produktes geführt. Als Standardtemperatur für alle folgenden Versuche wurde daher 15 °C festgelegt.

Der makroskopische Phänotyp der Kulturen bei 15 °C unterschied sich grundlegend von dem von Kultivierungen bei 30 °C. Anstatt freien Myzels hatten sich selbst beim Wildtyp

(Abb. 3.8 C, c) Pellets gebildet. Stämme mit nativer Glucoamylase oder *vib-1*⁺-Hintergrund hatten wesentlich mehr Biomasse erzeugt.

Obwohl nun Stämme existieren, welche keine Proteaseaktivität mehr aufweisen, und unter schonenden Bedingungen kultiviert wird, ist die Menge an sekretiertem Protein nur minimal. In der Literatur wird bei Glucoamylasen einiger filamentöser Pilze beschrieben, dass das Enzym Zellwand-assoziiert vorliegt (Norouzian *et al.*, 2006). Dies bedeutet, dass das Enzym zwar sekretiert wird, danach aber mit der Zellwand verknüpft wird, damit die Abbauprodukte der Stärke direkt aufgenommen werden können. Laut Gratzner (1972) geschieht diese Assoziation über Zuckermoleküle und es wird der Stamm *exo-1* beschrieben, bei welchem durch die veränderte Zuckerzusammensetzung der Zellwand die Glucoamylase nicht mehr mit dieser assoziiert werden kann (siehe Abschnitt 3.1.3).

Aus diesem Grund wurde mittels Kreuzung der Stamm DHN-075 (*gla-1::gla-1-ht186-d11, Δvib-1*) mit der *exo-1*-Mutation ergänzt (Stämme DHN-138/139/140). Hierfür musste zunächst ein Screening entwickelt werden, da *exo-1* nicht mittels PCR nachgewiesen werden kann (siehe Material und Methoden). Es folgte eine Kultivierung im Schüttelkolben in Minimalmedium mit Maltose (100 ml) bei 15 °C für bis zu 7 Tagen (Abb. 3.9).

Biomasseassoziiert gelang der Nachweis des Fusionsproteins hauptsächlich nach vier Tagen bei allen getesteten Produktionsstämmen (Abb. 3.9 A, a - e). Dabei erschien das Signal bei dem Stamm ohne *exo-1* und *Δvib-1* am stärksten. Die Kontrollen zeigten, dass es sich hierbei um ein spezifisches Signal handelt. Es war kein Unterschied zwischen den Produktionsstämmen mit und ohne *exo-1*-Mutation zu erkennen, welche ebenfalls eine Deletion von *vib-1* besitzen. Nach sieben Tagen gelang kein eindeutiger Nachweis mehr. Extrazellulär konnte bei dieser Kultivierung kein Nachweis des Fusionsproteins erbracht werden. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den vorangegangenen Kultivierungen. Die im Western Blot zu erkennenden Banden (Abb. 3.9 A, e, h, i) sind unspezifisch, da sie auch in den Kontrollen zu erkennen sind. Obwohl also der Organismus generell in der Lage zu sein scheint, heterologe Proteine zu produzieren und zu sekretieren, so gibt es nur einen kurzen Zeitraum, in welchem dieser Nachweis möglich ist. Dies zeigt sich daran, dass beim Stamm DHN-075 (*gla-1::gla-1-ht186-d11, Δvib-1*) nur in einem Fall der extrazelluläre Nachweis des Fusionsproteins gelang. Das Einbringen der *exo-1*-Mutation hat das Problem der fehlenden Sekretion nicht beheben können.

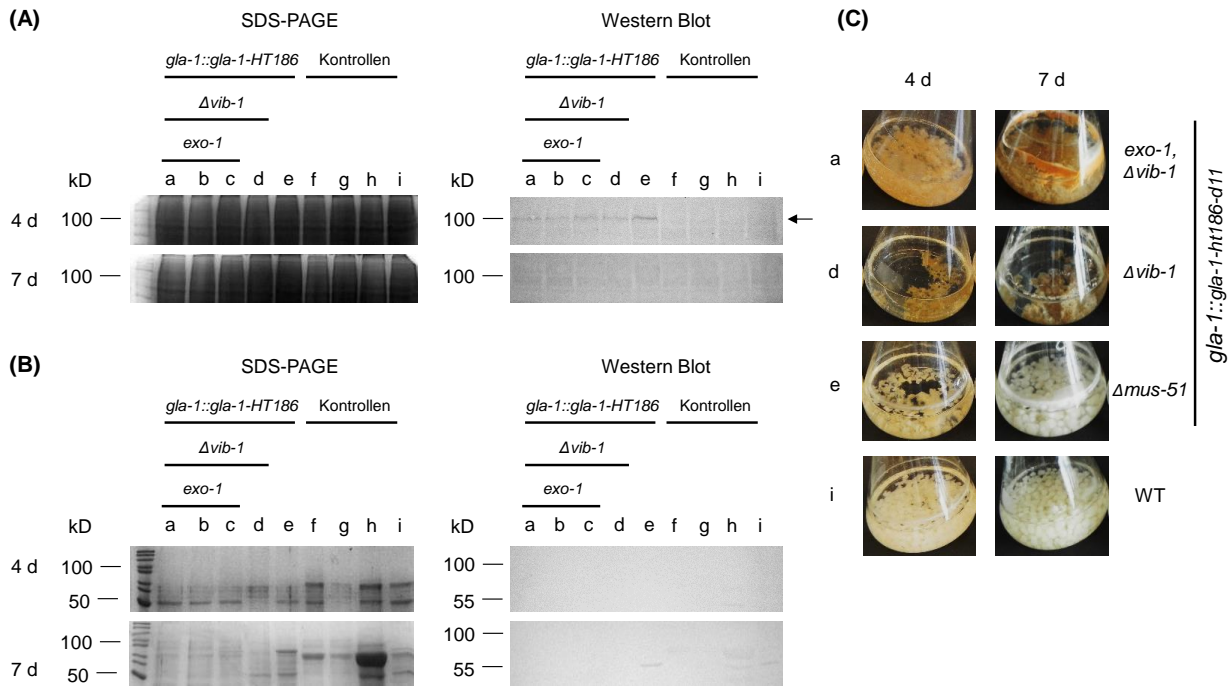


Abb. 3.9: Kein Nachweis von extrazellulärem GLA-1-HT186-D11 trotz Einbau von *exo-1* in den proteasedefizienten Produktionsstamm. Untersucht wurde die biomasseassoziierte Fraktion (A) und die extrazelluläre Fraktion (B) der bei 15 °C inkubierten Kulturen nach 4 und 7 Tagen bei Wachstum in Minimalmedium mit Maltose. Der makroskopische Phänotyp der Kulturen wurde dokumentiert (C). Die Biomasse wurde aufgeschlossen und die biomasseassoziierten Proteine isoliert. Pro Bahn wurde 1 µg Gesamtprotein aufgetragen. Proteine aus dem Kulturüberstand wurden gefällt (Faktor 30). Beide Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und über Coomassie-Färbung analysiert. In einem Western Blot wurde der *myc-tag* des Fusionsproteins detektiert. Folgende Stämme wurden kultiviert: (a) bis (c) drei äquivalente Produktionsstämme DHN-138 - 140 (*gla-1::gla-1-ht186-d11*, *Δvib-1*, *exo-1*), (d) DHN-075 (*gla-1::gla-1-ht186-d11*, *Δvib-1*), (e) DHN-063 (*gla-1::gla-1-ht186-d11-Tgla-hph*, *Δmus-51*), als Kontrollen (f) DHN-141 (*Δvib-1*, *exo-1*), (g) DHN-010 (*Δvib-1*), (h) DHN-082 (*exo-1*) und (i) Wildtyp (N1-01). Der Pfeil markiert die Laufhöhe des Fusionsproteins. Die Entwicklung des Western Blots erfolgte mittels Anfärbung der Membran mit NBT/BCIP-System.

An der Gesamtheit der sekretierten Proteine können dennoch wichtige Informationen über den Nutzen von *exo-1* abgelesen werden, wenn man die Kontrollstämme (Abb. 3.9 B, SDS-PAGE, f - i) betrachtet. *Δvib-1* führte zu einem niedrigeren Sekretionslevel der Glucoamylase im Vergleich zum Wildtyp. *exo-1* hingegen sekretierte nach 7 Tagen signifikant höhere Mengen dieses Proteins. Das Einbringen der *exo-1*-Mutation erhöhte auch in Stämmen mit *Δvib-1* das Sekretionslevel der Glucoamylase, sodass nach 7 Tagen wesentlich mehr Glucoamylase bei 70 kD zu erkennen war im Vergleich zum Wildtyp N1-01. Ein weiterer Vorteil von Stämmen mit *exo-1*-Hintergrund war der makroskopische Phänotyp in submerser Kultur, da Produktionsstämme mit beiden Mutationen *exo-1* und *Δvib-1* (Abb. 3.9 C, a) mehr Biomasse zu produzieren schienen als *Δvib-1* Stämme ohne *exo-1* (d). Außerdem erschienen diese Kulturen deutlich homogener, was bei späterer Kultivierung in einem Rührreaktor vorteilhaft sein könnte.

In diesem Abschnitt wurde gezeigt, dass *N. crassa* in der Lage ist, heterologes Protein in Form des Fusionsproteins GLA-1-HT186-D11 zu produzieren und vereinzelt auch zu sekretieren, jedoch erst nach der Kultivierung bei 15 °C in einem Stamm mit *Avib-1*-Hintergrund. Das Einbringen der *exo-1*-Mutation in den Produktionsstamm verbesserte die Sekretion des Produktes nicht.

3.2.4 Anpassung des Expressionssystems

Nachdem nur in einem Fall das sekretierte Produkt nachgewiesen werden konnte, sollte das Expressionssystem grundlegend verändert werden. Dabei sollten sowohl auf der genetischen als auch auf Proteinebene Veränderungen eingeführt werden.

Bislang wurde nur ein Promotor (*Pgla*) verwendet. Da aus der Literatur für *N. crassa* keine Informationen über Transkriptmengen des *gla-1*-Gens vorliegen, sollten weitere Promotoren getestet werden. Der Einbau am nativen Locus hat mehrere Nachteile wie z. B. das Ersetzen der Glucoamylase, welche eine wichtige Funktion bei Wachstum auf Maltose darstellt. Dieses ist anschließend verlangsamt, da das Fusionsprotein wahrscheinlich nicht mehr aktiv ist. Außerdem ist die Transformation komplizierter als bei der Integration am *his-3*-Locus, welcher in der Grundlagenforschung genutzt wird und dort zu reproduzierbaren Ergebnissen führt (Allgaier *et al.*, 2009; Riquelme *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2011). Eine weitere Veränderung sollte die Anpassung des *Carrier*-Proteins sein. Hier könnten Faltungsprobleme und die Größe des Gesamtproteins bei der Sekretion zu Problemen führen. Eine rationale Kürzung des Fusionsproteins wäre hierbei eine Möglichkeit, welche gleichzeitig eine Assoziation mit der Zellwand verhindern könnte.

Neben den Problemen der Produktion könnte es ebenfalls ein Problem bei der Detektion des Produktes geben. Bislang wurde ein unsensitives Nachweissystem nach dem Western Blot verwendet. Bei diesem System wird der *myc-tag* vom Primärantikörper gebunden. Über eine Anfärbung direkt auf der Membran wird dann das Zielprotein sichtbar gemacht. Da die Färbung lange dauern kann, ist der Unterschied zwischen spezifischem und unspezifischem Signal häufig minimal. Daher sollen zwei Anpassungen erfolgen. Für eine spezifischere Bindung des Antikörpers soll eine Aneinanderreihung des *myc-tags* (13×*myc*) verwendet werden. Außerdem wird eine sehr sensitive Detektion mittels Elektrochemolumineszenz (ECL) eingeführt. Dadurch können selbst geringste Mengen an Protein detektiert werden.

All diese Veränderungen sollen sowohl das Expressionssystem als auch die Detektion grundlegend verbessern und zu einer reproduzierbaren Produktion und Sekretion des Fusionsproteins führen.

3.3 Produktion von Antikörperfusionsproteinen basierend auf einer gekürzten Form der Glucoamylase als *Carrier*

3.3.1 Einführung eines neuen modularen Expressionssystems mit abgewandeltem *Carrier*-Protein

Im vorangegangenen Abschnitt wurde gezeigt, dass die Verwendung der vollständigen Glucoamylase als *Carrier*-Protein nur zu einer geringen Produktion des Fusionsproteins führt. Ein Grund für die minimalen Mengen wurde in Problemen bei der Faltung des Proteins vermutet. Die Lösung hierfür sollte die Kürzung der Glucoamylase bringen. Diese besteht in nativer Form aus einer katalytischen Domäne, einer Linkerdomäne und einer stärkebindenden Domäne. Die Präform des Proteins besitzt am N-Terminus ein Signalpeptid, welches für die Sekretion essentiell ist (Stone *et al.*, 1993). Daher kann auf diese Domäne nicht verzichtet werden. Zwischen katalytischer und stärkebindender Domäne befindet sich die Linkerdomäne, die der separaten Faltung beider Domänen verhilft. Diese räumliche Trennung sollte die Grundlage für ein neuartiges Fusionsprotein sein, bei welchem die stärkebindende Domäne durch das heterologe Protein ersetzt wird. Zum einen könnten dadurch Faltungsprobleme gelöst werden und das Fusionsprotein wird in seiner Größe reduziert. Zum anderen wurde bei verschiedenen *Aspergillus spp.* berichtet, dass die Zellwandassoziation der Glucoamylase über die stärkebindende Domäne erfolgt (Norouzian *et al.*, 2006). Wäre dies bei *N. crassa* ebenfalls der Fall, so könnte auch das Assoziationsproblem behoben werden und das Fusionsprotein könnte vermehrt im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Das neue Fusionsprotein enthält nun keinen artifiziellen Linker mehr und der *tag* wurde durch einen $13 \times myc\text{-tag}$ ersetzt (Abb. 3.10).

Die gekürzte Glucoamylase GLA_t (engl. *truncated* = gekürzt) bestand aus 519 Aminosäuren (anstatt 626 Aminosäuren) und endete mit der letzten Aminosäure der Linkerregion (Coutinho & Reilly, 1994). Da bislang keine Produktion des scFv D1.3 gelang, sollte nur ein Fusionsprotein mit HT186-D11 als Modellprotein generiert werden. Für einen Kontrollstamm sollte ein Fusionsprotein ohne scFv generiert werden (nur GLA_t und $13 \times myc\text{-tag}$), um einen negativen Einfluss von HT186-D11 auf die Produktion zu überprüfen.

Die Integration der Expressionskassette sollte am *his-3*-Locus erfolgen, da dieser Locus laborintern etabliert und in der Literatur gut beschrieben ist (Schürg *et al.*, 2012). Ein entscheidender Vorteil ist die einfache Transformation und Selektion sowie reproduzierbare Expressionsmuster, der Erhalt der nativen Glucoamylase und dadurch robustes Wachstum auf Maltose.

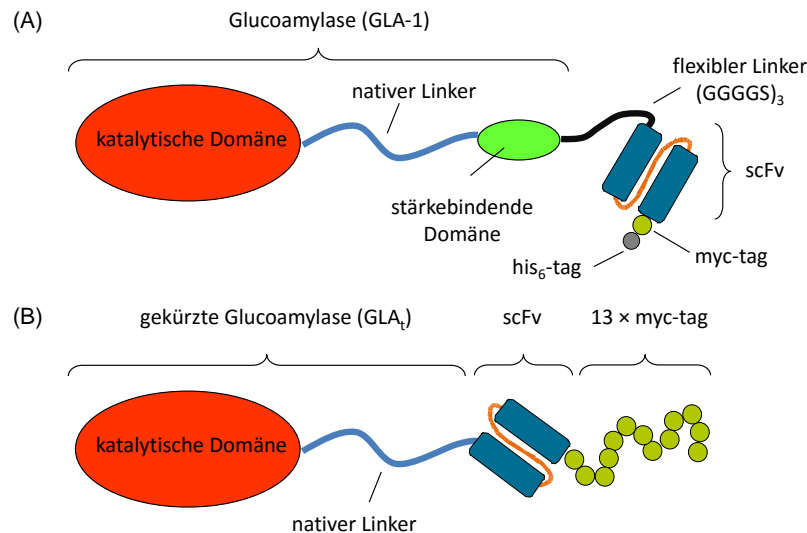


Abb. 3.10: Gegenüberstellung der Fusionsproteine mit vollständiger Glucoamylase (A) und neuartiger gekürzter Glucoamylase GLA_t (B). Die stärkebindende Domäne wurde deletiert und der scFv direkt mit der Linkerdomäne fusioniert. Der Doppel-tag aus myc- und his-tag wurde durch einen 13 × myc-tag ersetzt.

Mit der Generierung eines neuen Fusionsproteins wurde gleichzeitig ein modulares Plasmid auf der Basis von pMF276 eingeführt (Honda & Selker, 2009), welches die Integration am *his-3*-Locus ermöglicht und das Gen des 13 × myc-tags beinhaltet. Ziel des modularen Plasmids war es, jedes essentielle Element einfach austauschen zu können. Dies wurde durch Erzeugung von Restriktionsschnittstellen (Erkennungssequenz von 8 bp) erreicht (Abb. 3.11).

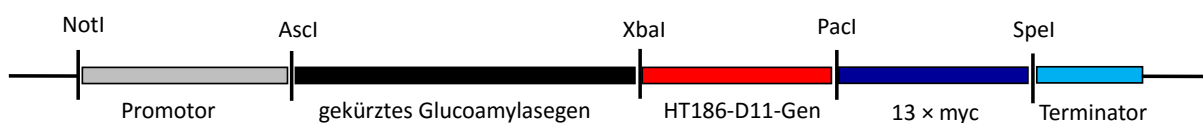


Abb. 3.11: Schematische Darstellung der Expressionskassette des neuartigen modularen Plasmids. Jedes essentielle Element kann durch die Kombination aus zwei Restriktionsschnittstellen ausgewechselt werden.

Eine grundlegende Veränderung ist die Verwendung eines neuen Terminators. Da über den Glucoamylase-Terminator keine Informationen in der Literatur zu finden sind, wurde der in pMF276 verwendete Terminator beibehalten. Ein Sequenzvergleich hat ergeben, dass es sich hierbei um den Terminator von *adh1* aus *Saccharomyces cerevisiae* handelt.

Um nicht nur auf den Glucoamylase-Promotor angewiesen zu sein, wurden zwei weitere Promotoren eingeführt. Der *ccg-1*-Promotor (*clock controlled gene*) ist ein in der

Grundlagenforschung etablierter Promotor aus *N. crassa* (Allgaier *et al.*, 2010; McNally & Free, 1988; Sun *et al.*, 2011), welcher als Glucose-reprimiert beschrieben wird, unter Laborbedingungen jedoch häufig konstitutiv exprimiert wird (persönliche Erfahrung). Mit dem *vvd*-Promotor (*vivid*, ebenfalls aus *N. crassa*) sollte ein durch Licht induzierbarer Promotor getestet werden (Hurley *et al.*, 2012), welcher bereits in der Bachelorarbeit von Paula Werner etabliert wurde (Werner, 2013).

Mittels *Yeast recombinational cloning* wurden die Expressionskassetten erzeugt und in pMF276 umklontiert. Die drei generierten Plasmide wurden für die Transformation des bereits proteasedefizienten Stammes DHN-077 (*his-3⁻*, *Δvib-1*) eingesetzt, welcher vorher durch Kreuzung erzeugt wurde. Die Transformanten wurden mittels PCR überprüft und über eine Einzelsporisolierung aufgereinigt. Nach dieser wurden die Stämme erneut mittels PCR bestätigt (siehe Anhang). Es wurden somit drei Produktionsstämme mit dem vollständigen Fusionsprotein GLA₁-HT186-D11 (DHN-117, DHN-118, DHN-120) und ein Stamm lediglich mit der getagten Glucoamylase (kontrolliert durch *Pgla*, DHN-129) generiert.

3.3.2 Expression von GLA₁-HT186-D11 mit drei verschiedenen Promotoren

Mit dem folgenden Versuch sollte die Produktion unter Verwendung unterschiedlicher Promotoren verglichen werden. Für die Analyse der verschiedenen Promotoren werden in der Literatur diverse Kohlenstoffquellen (C-Quellen) in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet. Um den Einfluss dieser C-Quellen auf die Promotoren zu untersuchen, wurden Glucose (18 g/L), Saccharose (20 g/L), Acetat (12 g/L) und Maltose (10 g/L) als C-Quellen eingesetzt. Mit Maltose wurden bislang die erfolgreichen Nachweise des heterologen Proteins erreicht, Glucose wurde in der Originalpublikation des *vvd*-Promotors eingesetzt (Hurley *et al.*, 2012), Saccharose ist standardmäßig im Minimalmedium enthalten (Vogel, 1956) und Acetat kann die Produktion bei der Verwendung des *ccg-1*-Promotors verbessern (Sun *et al.*, 2011). Die im vorangegangenen Abschnitt erzeugten Stämme wurden für 7 Tage bei 15 °C in Minimalmedium mit diesen C-Quellen kultiviert und die Produktion des Fusionsproteins wurde überprüft. Bei dieser Kultivierung wurde systematisch jeder Stamm in jedem Medium kultiviert. Zum Vergleich wurde ein Stamm mit der ungekürzten Form des Fusionsproteins kultiviert (GLA-1-HT186-D11, Integration am nativen Genort). Da alle Stämme einen *Δvib-1*-Hintergrund besaßen, wurde die entsprechende Deletionsmutante ebenfalls kultiviert. Die Produktion durch diese Stämme wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot überprüft (Abb. 3.12).

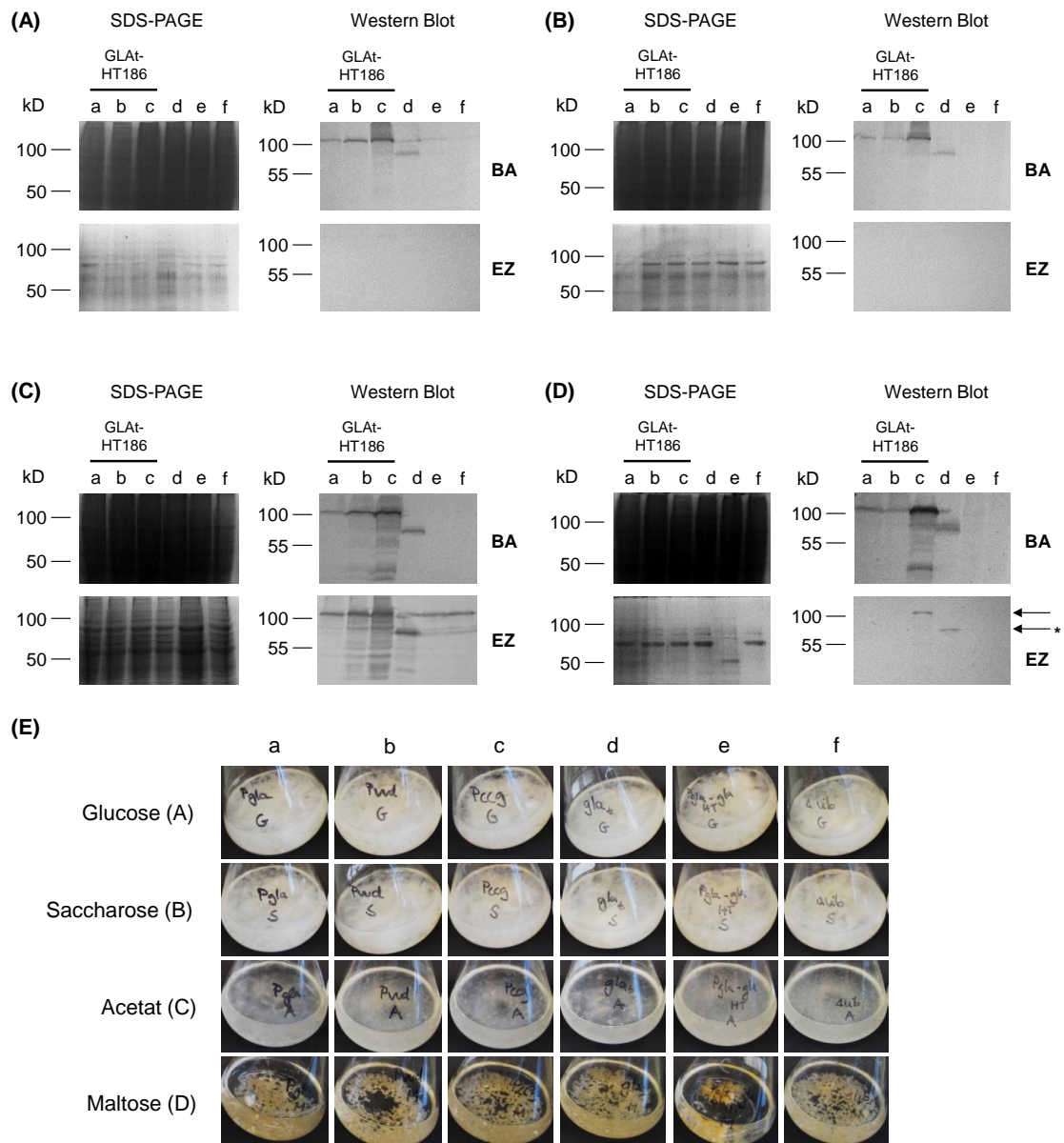


Abb. 3.12: Die Verwendung unterschiedlicher Promotoren führte zu unterschiedlich hohen Mengen an Fusionsprotein. Dieses beinhaltete die gekürzte Variante der Glucoamylase (GLAt) als *Carrier*. Kultiviert wurde bei 15 °C in Minimalmedium mit (A) 18 g/L Glucose, (B) 20 g/L Saccharose, (C) 12 g/L Acetat und (D) 10 g/L Maltose. Untersucht wurde die biomasseassoziierte Fraktion (BA) und die extrazelluläre Fraktion (EZ) der Kulturen nach 7 Tagen. Die Biomasse wurde aufgeschlossen und die biomasseassoziierten Proteine isoliert. Pro Bahn wurde 1 µg Gesamtprotein aufgetragen. Proteine aus dem Kulturüberstand wurden gefällt. Beide Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und über Coomassie-Färbung analysiert. In einem Western Blot wurde der *myc-tag* des Fusionsproteins detektiert. Der makroskopische Phänotyp der Kulturen wurde dokumentiert (E). Bei den Produktionsstämmen beinhaltete die Expressionskassette (a) den Glucoamylase-Promotor (DHN-117: *his-3⁺::PglA-glat-ht186-13×myc, Δvib-1*), (b) den *vvd*-Promotor (DHN-118: *his-3⁺::Pvvd-glat-ht186-13×myc, Δvib-1*) und (c) den *ccg-1*-Promotor (DHN-120: *his-3⁺::Pccg-1-glat-ht186-13×myc, Δvib-1*). Als Kontrolle wurde (d) ein Stamm mit der gekürzten Glucoamylase und *13×myc-tag* verwendet (DHN-129: *his-3⁺::PglA-glat-13×myc, Δvib-1*), ebenso (e) ein Stamm mit dem zuvor genutzten Expressionssystem (DHN-075: *gla-1::gla-1-ht186-d11, Δvib-1*) und (f) der Kontrollstamm DHN-010 (*Δvib-1*). Der Pfeil ohne Stern markiert die Laufhöhe des Fusionsproteins, der Pfeil mit Stern (*) die Laufhöhe der getagten Glucoamylase. Die Entwicklung des Western Blots erfolgte mittels Anfärbung der Membran mit NBT/BCIP-System.

Ziel dieser Kultivierung war der Vergleich der drei verwendeten Promotoren. Bei allen Promotoren wurde biomasseassoziiert der $13 \times myc\text{-tag}$ auf den erwarteten Laufrhöhen der Fusionsproteine detektiert (105 kD bei GLA_t -HT186-D11 und 75 kD bei GLA_t) und somit die Fusionsproteine nachgewiesen. Unabhängig von der C-Quelle war das Signal bei *Pccg-1* am stärksten und bei *Pgla* am schwächsten. Insbesondere bei Maltose als C-Quelle wurde bei *Pccg-1* eine verhältnismäßig große Menge an Fusionsprotein produziert (Abb. 3.12, (D), c). Bei ca. 40 kD wurden allerdings auch Abbauprodukte des Produktes nachgewiesen. Bei Verwendung von Acetat und Maltose konnten die Fusionsproteine im Kulturüberstand detektiert werden. Jedoch waren bei Verwendung von Acetat auch sehr viele Abbauprodukte zu sehen. Da die Kultur eine nicht sehr große Biomassekonzentration erreicht hatte, wird davon ausgegangen, dass es sich hierbei um Lyse handelt, durch welche intrazellulär vorliegendes Fusionsprotein in den Kulturüberstand gelangte. Somit lag wahrscheinlich keine gerichtete Sekretion vor. Dies ist ebenfalls an der Gesamtheit der Proteine im Überstand zu erkennen (Abb. 3.12 C, SDS-PAGE, EZ). Bei Verwendung von Maltose schienen die Kulturen normal zu wachsen. Auch hier konnte das Fusionsprotein bei der Verwendung von *Pccg-1* eindeutig im Kulturüberstand detektiert werden sowie GLA_t unter der Kontrolle von *Pgla*. Die Konzentration dieser Proteine im Überstand scheint jedoch zu gering zu sein, um sie auf dem entsprechenden SDS-PAGE-Gel zu sehen (unterhalb der Nachweisgrenze von ca. 100 ng). Aus dem gleichen Gel ist zu entnehmen, dass die Stämme des angepassten Expressionssystems die native Glucoamylase sekretierten (a bis d) im Gegensatz zum Stamm mit dem ursprünglichen System (e).

Bei keiner einzigen C-Quelle konnte das Fusionsprotein des ursprünglichen Expressionssystems mit vollständiger Glucoamylase detektiert werden. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass dieses Protein lediglich einen $1 \times myc\text{-tag}$ enthält und daher bei gleichen Proteinmengen zu geringeren Signalen im Western Blot führt als das Fusionsprotein mit $13 \times myc\text{-tag}$. Betrachtet man jeweils die Kultivierungen, in denen verschiedene Stämme auf der gleichen C-Quelle kultiviert wurden, so waren alle Stämme mit nativer Glucoamylase (Abb. 3.12 E, a – d und f) gleich gewachsen. Im Fall von Glucose und Saccharose ist normales Myzelwachstum ohne Verfärbung beobachtet worden. Auch bei Verwendung von Acetat wuchsen die Kulturen als Myzel, jedoch wurde wesentlich weniger Biomasse erreicht (transparentes Erscheinungsbild der Kulturen). Im Fall von Maltose wurden Pellets gebildet, welche bräunlich gefärbt waren. Der Stamm DHN-075 (besitzt keine native Glucoamylase) bildete unter dieser Bedingung wesentlich weniger Biomasse. Bei den übrigen C-Quellen waren keine Unterschiede zu den anderen Stämmen zu beobachten.

Die Anpassung des Expressionssystems war erfolgreich. Dies ist wahrscheinlich in der Verwendung des *13×myc-tags* begründet, da das Signal um ein Vielfaches verstärkt ist. Dadurch wurde ein spezifischeres und stärkeres Signal bei gleichzeitiger Verringerung des Hintergrundes erreicht. Von allen drei getesteten Promotoren hat biomasseassoziiert *Pccg-1* zur höchsten Proteinproduktion geführt, gefolgt von *Pvvd* und *Pgla*. *Pgla* ist der einzige Promotor, welcher im ursprünglichen Expressionssystem verwendet wurde. Bei nachfolgenden Versuchen wurde nur noch Maltose als C-Quelle verwendet, da hier beim *ccg-1*-Promotor das Fusionsprotein sekretiert wurde. Es ist möglich, dass dies nur dadurch erreicht werden konnte, da hier intrazellulär die größte Menge an Fusionsprotein vorlag. Parallel dazu fehlt bei der gekürzten Glucoamylase die stärkebindende Domäne, was vielleicht die Assoziation mit der Zellwand reduziert hat.

Um wie beim ursprünglichen Expressionssystem den Einfluss der *exo-1*-Mutation zu untersuchen, wurden entsprechende neue Stämme generiert.

3.3.3 Expression von GLA_t-HT186 in Stämmen mit *Δvib-1* und *exo-1*

Für die Ergänzung der Produktionsstämme mit *exo-1* sollten grundlegend neue Transformationsstämme erzeugt werden, welche später mit den Expressionskassetten aus Abschnitt 3.3.1 transformiert werden sollten. Neben der *exo-1*-Mutation sollte ebenfalls der Repressor des *vvd*-Promotors deletiert werden (*Δvvd*), wodurch bei diesem Promotor die Produktion gesteigert werden sollte und dadurch sogar höhere Produktmengen als mit dem *ccg-1*-Promotor erreicht werden könnten (Hurley *et al.*, 2012).

Bei der Verwendung des ursprünglichen Expressionssystems wurde deutlich, dass für das Wachstum der Kultur die native Glucoamylase nicht zwingend benötigt wird. Im Falle der Expression von GLA-1-HT186-D11 wurde nur eine sehr geringe Menge an Fusionsprotein und daher auch fast keine Glucoamylase gebildet, da das native Glucoamylasegen ersetzt wurde. Dennoch konnten diese Stämme in Minimalmedium mit Maltose mit einer geringeren Geschwindigkeit wachsen, da wahrscheinlich andere Enzyme Maltose-spaltende Aktivität aufweisen. Bei der Proteinisolation ist es dabei von Vorteil, wenn im Kulturüberstand so wenig andere Proteine wie möglich vorhanden sind. Es wurden daher durch Kreuzung die zwei transformierbaren Stämme DHN-157 (*his-3*, *exo-1*, *Δvib-1*, *Δvvd*) und DHN-160 (*his-3*, *exo-1*, *Δvib-1*, *Δvvd*, *Δgla-1*) erzeugt (siehe Anhang). Diese zwei Stämme wurden anschließend mit den Plasmiden, welche drei unterschiedliche Expressionskassetten trugen, transformiert.

Es wurde bei 15 °C kultiviert, da die Möglichkeit besteht, dass durch die Codonoptimierung des scFv-Gens die Zellen durch zu schnelle Synthese der mRNA überfordert sind und eine geringe Temperatur diesem Effekt entgegenwirkt. Eine weitere Option, dieses Problem zu lösen, ist eine Verwendung des nicht Codon-optimierten Gens, bei welchem die mRNA-Synthese verlangsamt sein könnte. Zu diesem Zweck wurde ein Plasmid generiert, welches eine Genkopie von HT186-D11 mit der humanen Sequenz (HT186_{orig}) enthielt. Dieses Gen wurde nur mit dem *ccg-1*-Promotor kombiniert (*Pccg-1-glat-ht186orig-13×myc*). Auch mit diesem Plasmid wurden beide Stämme transformiert. Alle Stämme wurden in Einzelsporisolierungen aufgereinigt und mittels PCR bestätigt (siehe Anhang).

Mit diesen neuen Stämmen (vier Produktionsstämme mit *gla-1*⁺, vier Stämme mit Δ *gla-1*) wurden Kultivierungen bei 15 °C und 25 °C in Minimalmedium mit Maltose durchgeführt. Dadurch sollte getestet werden, ob die Verwendung von 15 °C tatsächlich vorteilhaft ist. Die Produktion wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot überprüft. Als Kontrolle wurde ein Stamm mit gleicher Expressionskassette (basierend auf *gla_I*), jedoch ohne *exo-1*-Mutation kultiviert. Für den Western Blot wurden als Kontrolle Stämme mit gleichem genetischen Hintergrund verwendet, welche auf den Transformationsstämmen DHN-157 und DHN160 beruhen, jedoch *his-3*⁺ sind.

Die Schwierigkeit in der Durchführung dieses Versuches lag in der Verwendung von zwei grundlegend unterschiedlichen Temperaturen. Dadurch wachsen die Stämme verschieden schnell. Generell sollten die Kulturen zu einem vergleichbaren Zeitpunkt geerntet werden, wodurch ein Vergleich der Produktion ermöglicht wird. Dafür wurde bei den Kontrollstämmen die Maltosekonzentration gemessen. Die Ernte sollte durchgeführt werden bevor die Maltose verbraucht war, um eine Absterbephase zu vermeiden, in welcher auch intrazelluläre Proteasen freigesetzt werden könnten. Stämme mit *gla-1*⁺-Hintergrund wurden für 42 h bei 25 °C und 90 h bei 15 °C kultiviert, Stämme mit Δ *gla-1* für 57 h bei 25 °C und 120 h bei 15 °C (Abb. 3.13 A). Der Phänotyp der Kulturen wird exemplarisch anhand der Kultivierung bei 15 °C gezeigt (Abb. 3.13 B).

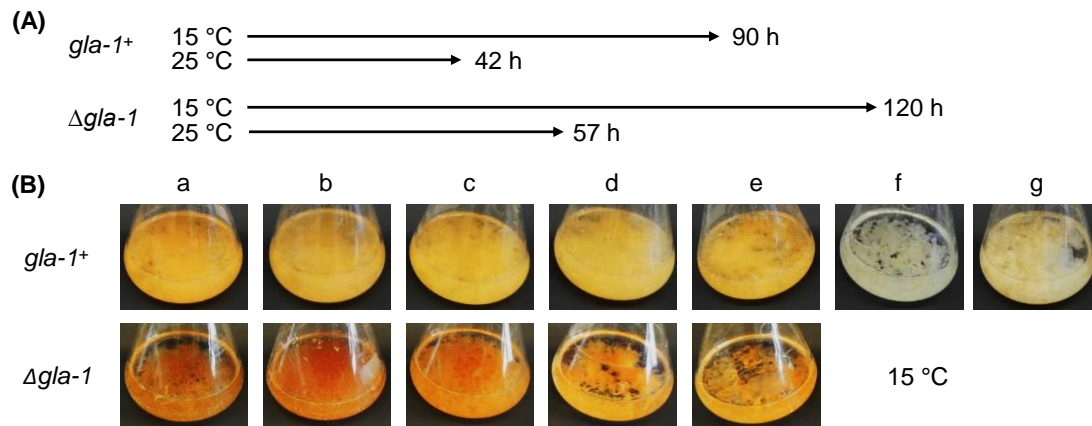


Abb. 3.13: Stämme mit *gla-1⁺*-Hintergrund produzierten wesentlich mehr Biomasse als Stämme mit Δ *gla-1*-Hintergrund. (A) Schematischer Überblick über die Kultivierungszeiten. (B) Makroskopische Phänotypen der Kulturen bei 15 °C. Bei den Produktionsstämmen beinhaltete die Expressionskassette das Codon-optimierte *ht186*-Gen und (a) den Glucoamylase-Promotor (*his-3⁺::Pgla-glat-ht186-13×myc*), (b) den *vvd*-Promotor (*his-3⁺::Pvvd-glat-ht186-13×myc*) und (c) den *ccg-1*-Promotor (*his-3⁺::Pccg-1-glat-ht186-13×myc*) sowie (d) den Stamm mit humaner *ht186*-Sequenz (*his-3⁺::Pccg-1-glat-ht186orig-13×myc*). Als Kontrolle wurde (e) ein Stamm ohne Expressionskassette verwendet (*his-3⁺*). Alle Stämme haben einen Δ *vib-1*, Δ *vvd*, *exo-1*, \pm Δ *gla-1*-Hintergrund. Zusätzliche Kontrollen waren (f) ein Produktionsstamm ohne *exo-1*-Mutation (DHN-120: *his-3⁺::Pccg-1-glat-ht186-13×myc*, Δ *vib-1*) und (g) DHN-141 (Δ *vib-1*, *exo-1*).

Alle Stämme mit der *vvd*-Deletion (Abb. 3.13 B, a - e) wiesen eine kräftige Orangefärbung auf, wobei Stämme mit der zusätzlichen *gla-1*-Deletion wesentlich stärker gefärbt waren. Erneut zeigte sich, dass bei Produktionsstämmen die *exo-1*-Mutation zu einer Steigerung der Biomasseproduktion im gleichen Zeitraum führt (Abb. 3.13, e und f). Stämme ohne native Glucoamylase wuchsen wesentlich langsamer als Stämme mit diesem Enzym. Die Produktion des Fusionsproteins bei Stämmen mit *gla-1⁺*-Hintergrund (Abb. 3.14) und mit *gla-1*-Deletion (Abb. 3.15) wurde überprüft.

Bei den Stämmen mit nativer Glucoamylase (Abb. 3.14) konnten biomasseassoziiert das Fusionsprotein bei beiden Temperaturen und allen Promotoren nachgewiesen werden. Leichte Unterschiede tauchten hier in der Laufhöhe der Fusionsproteine auf. Bei allen Promotoren zeigten sich geringe Konzentrationen an Abbauprodukten (z. B. bei 55 kD). Ein Vergleich bezüglich der Codon-Optimierung zeigte bei beiden Temperaturen auf, dass bei Codon-Optimierung (Bahn c) mehr Fusionsprotein produziert wurde als ohne Optimierung (Bahn d). Die Analyse mittels SDS-PAGE der extrazellulären Fraktion zeigte, dass ungefähr die gleiche Menge an Gesamtprotein sekretiert wurde, was an der Glucoamylase-Bande bei 70 kD zu erkennen ist. Fusionsprotein konnte allerdings lediglich bei 25 °C beim *ccg-1*-Promotor mit Codon-optimiertem *ht186* in Form von Abbauprodukten nachgewiesen werden (Abb. 3.14, (B), EZ, c). Beim Kontrollstamm ohne *exo-1* (Bahn f) wurde neben Abbauprodukten auch das vollständige Fusionsprotein nachgewiesen (bei ca. 105 kD).

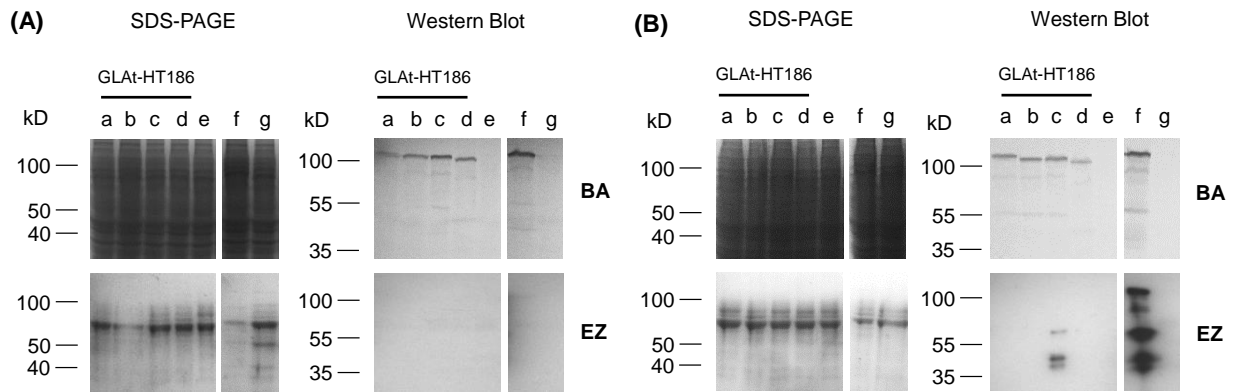


Abb. 3.14: Bei Stämmen mit *exo-1*- und *gla-1*⁺-Hintergrund konnte unter Kontrolle verschiedener Promotoren extrazellulär kein Fusionsprotein oder nur Abbauprodukte detektiert werden. Kultiviert wurde bei 15 °C (A) für 90 h und 25 °C (B) für 42 h in Minimalmedium mit Maltose (10 g/L). Untersucht wurde die biomasseassoziierte Fraktion (BA) und die extrazelluläre Fraktion (EZ) der Kulturen. Die Biomasse wurde aufgeschlossen und die biomasseassoziierten Proteine isoliert. Pro Bahn wurde 1 µg Gesamtprotein aufgetragen. Proteine aus dem Kulturüberstand wurden gefällt. Beide Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und über Coomassie-Färbung analysiert. In einem Western Blot wurde der *myc-tag* des Fusionsproteins detektiert. Bei den Produktionsstämmen beinhaltete die Expressionskassette das Codon-optimierte *ht186*-Gen und (a) den Glucoamylase-Promotor (DHN-177: *his-3*⁺::*Pgla-glat-ht186-13*×*myc*), (b) den *vvd*-Promotor (DHN-201: *his-3*⁺::*Pvvd-glat-ht186-13*×*myc*) und (c) den *cgg-1*-Promotor (DHN-172: *his-3*⁺::*Pcgg-1-glat-ht186-13*×*myc*). Zusätzlich wurden (d) ein Stamm mit humaner *ht186*-Sequenz (DHN-210: *his-3*⁺::*Pcgg-1-glat-ht186orig-13*×*myc*) und als Kontrolle (e) ein Stamm ohne Expressionskassette kultiviert (DHN-169: *his-3*⁺). Alle Stämme haben einen $\Delta vib-1$, Δvvd , *exo-1*-Hintergrund. Zusätzliche Kontrollen waren (f) ein Produktionsstamm ohne *exo-1*-Mutation (DHN-120: *his-3*⁺::*Pcgg-1-glat-ht186-13*×*myc*, $\Delta vib-1$) und (g) DHN-141 ($\Delta vib-1$, *exo-1*). Die Entwicklung des Western Blots erfolgte bei der BA-Fraktion mittels Anfärbung der Membran mit NBT/BCIP-System. Bei der EZ-Fraktion wurde die sensitivere ECL-Methode verwendet.

Bei der Kultivierung der Produktionsstämmen ohne native Glucoamylase ($\Delta gla-1$) konnte das Fusionsprotein ebenfalls in der biomasseassoziierten Fraktion nachgewiesen werden (Abb. 3.15). Auch hier waren Promotor-übergreifend Abbauprodukte zu erkennen, beim *cgg-1*-Promotor wurde die größte Menge an Fusionsprotein produziert. Ebenfalls bestätigte sich die höhere Produktion bei Verwendung des Codon-optimierten Gens unabhängig von der Kultivierungstemperatur.

Extrazellulär konnte bei der Kultivierung von $\Delta gla-1$ -Produktionsstämmen ein eindeutiger Nachweis der Fusionsproteine im Kulturüberstand erbracht werden, darunter zum ersten Mal bei der Verwendung des Licht-induzierbaren *vvd*-Promotors. In allen Fällen wurden sowohl das vollständige Produkt (ca. 105 kD) als auch Abbauprodukte detektiert. Vergleicht man entsprechende Stämme mit und ohne *exo-1*-Mutation (jeweils Bahn c und g), so führte diese anscheinend bei 15 °C zu mehr Produkt, bei 25 °C hingegen scheint die sekretierte Menge gleich zu sein. Auch extrazellulär hatte die Codon-Optimierung zu mehr Produkt geführt (Bahn c und d). Die SDS-PAGE-Gele der extrazellulären Fraktion zeigen, dass Stämme mit $\Delta gla-1$ ein Protein (bei 50 kD) verstärkt freisetzen (Bahn a – e), welches bei *gla-1*⁺ (Bahn f und g) nicht vorhanden ist und wahrscheinlich für den Abbau der Maltose zu Glucose verantwortlich

ist. Des Weiteren erhöhte die Einführung von *exo-1* in einen $\Delta vib-1$ -Stamm die Sekretion der Glucoamylase (Abb. 3.15 A, Bahn f und g).

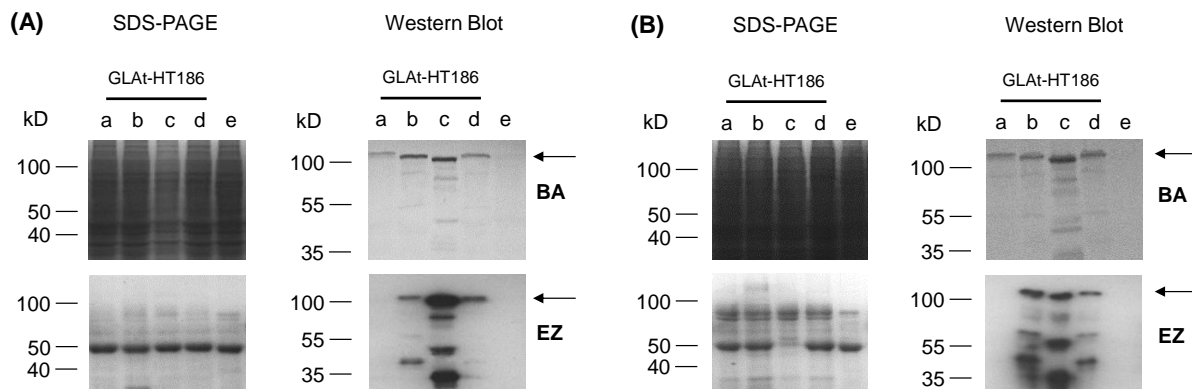


Abb. 3.15: Eindeutiger extrazellulärer Nachweis des vollständigen Fusionsproteins unter Kontrolle verschiedener Promotoren bei Stämmen mit *exo-1*- und $\Delta gla-1$ -Hintergrund. Kultiviert wurde bei 15 °C (A) für 120 h und 25 °C (B) für 57 h in Minimalmedium mit Maltose (10 g/L). Untersucht wurde die biomasseassoziierte Fraktion (BA) und die extrazelluläre Fraktion (EZ) der Kulturen. Die Biomasse wurde aufgeschlossen und die biomasseassoziierten Proteine isoliert. Pro Bahn wurde 1 µg Gesamtprotein aufgetragen. Proteine aus dem Kulturüberstand wurden gefällt. Beide Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und über Coomassie-Färbung analysiert. In einem Western Blot wurde der *myc-tag* des Fusionsproteins detektiert. Bei den Produktionsstämmen beinhaltete die Expressionskassette das Codon-optimierte *ht186*-Gen und (a) den Glucoamylase-Promotor (DHN-178: *his-3⁺::P_{gla}-glat-ht186-13×myc*), (b) den *vvd*-Promotor (DHN-182: *his-3⁺::P_{vvd}-glat-ht186-13×myc*) und (c) den *ccg-1*-Promotor (DHN-176: *his-3⁺::P_{ccg-1}-glat-ht186-13×myc*). Zusätzlich wurden (d) ein Stamm mit humaner *ht186*-Sequenz (DHN-211: *his-3⁺::P_{ccg-1}-glat-ht186orig-13×myc*) und als Kontrolle (e) ein Stamm ohne Expressionskassette kultiviert (DHN-170: *his-3⁺*). All diese Stämme haben einen $\Delta vib-1$, Δvvd , $\Delta gla-1$, *exo-1*-Hintergrund. Die Entwicklung des Western Blots erfolgte bei der BA-Fraktion mittels Anfärbung der Membran mit NBT/BCIP-System. Bei der EZ-Fraktion wurde die sensitivere ECL-Methode verwendet.

An dieser Stelle stellte sich die Frage, warum bei Stämmen mit *gla-1⁺* nur in einem Fall der Nachweis des heterologen Proteins gelang (und dies nur als Abbauprodukt) und bei $\Delta gla-1$ -Stämmen durchgehend bei den Promotoren *Pvvd* und *Pccg-1* unabhängig von der Temperatur das Produkt nachgewiesen wurde. Außerdem deutete der Nachweis von Abbauprodukten auf Proteaseaktivität hin. Theoretisch hätte diese durch die Verwendung der *vib-1*-Deletion beseitigt sein sollen. Um den Kulturüberstand auf Proteaseaktivität zu überprüfen, wurde ein Protease-Assay (wie in Abschnitt 3.1 beschrieben) durchgeführt. Dabei wurden die Kulturüberstände der beschriebenen Kultivierungen mit HT186-D11 (produziert in *E. coli*) inkubiert und mittels SDS-PAGE auf Abbau des Proteins überprüft (Abb. 3.16).

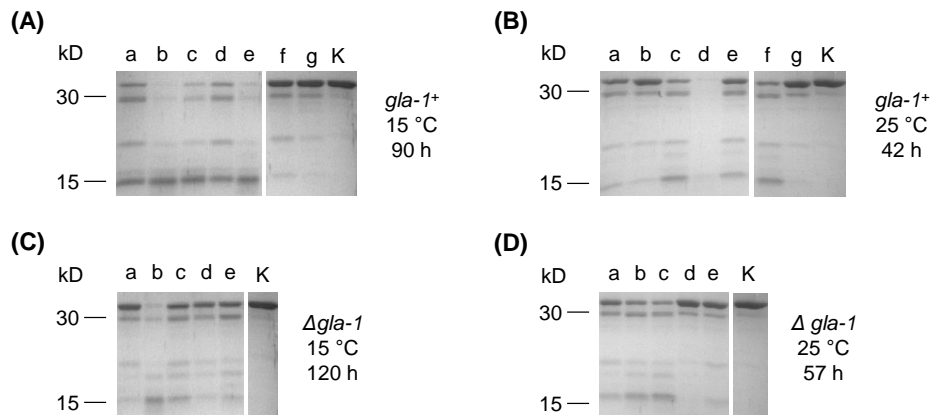


Abb. 3.16: Nachweis von Proteaseaktivität bei Produktionsstämmen trotz Einbau von $\Delta vib-I$. Verglichen wurden Produktionsstämme mit und ohne native Glucoamylase. (A) und (B) beinhalten die Daten der Kultivierungen der Stämme mit $gla-I^+$ -Hintergrund, in (C) und (D) wurden Stämme mit $\Delta gla-I$ -Hintergrund kultiviert. Erntezeitpunkte und Kultivierungstemperaturen sind der jeweiligen Grafik zu entnehmen. Bei (A) und (B) wurden exakt die gleiche Reihenfolge und Stämme aus Abb. 3.14 verwendet, bei (C) und (D) sind nähere Stamminformationen in Abb. 3.15 zu finden. Kulturüberstände wurden mit HT186-D11 (produziert in *E. coli*, ca. 1 μ g) für 24 h bei 30 °C inkubiert. Als Kontrolle wurde der scFv mit Medium (K) inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Ein Fehlen der Bande bei 30 kD weist auf eine Proteaseaktivität hin.

Der Protease-Assay zeigte eindeutig Proteaseaktivität in fast allen Kulturen auf. Die Aktivität erschien bei den $\Delta gla-I$ -Kulturen geringer als bei den $gla-I^+$ -Kulturen. Ein exaktes Muster war allerdings nicht zu erkennen. In Abschnitt 3.1.2 wurde jedoch gezeigt, dass Stämme mit $\Delta vib-I$ unter Wachstumsbedingungen keine Proteasen mehr ins Medium freisetzen.

Durch die unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeit ist es möglich, dass sich einige Kulturen bereits in der Absterbephase befanden und daher Proteasen freigesetzt haben. Um zu überprüfen, ob das Substrat (Maltose) bereits bei Ernte verbraucht war, wurde die Maltosekonzentration gemessen und berechnet, welcher Anteil der Ursprungskonzentration noch vorhanden war (Abb. 3.17).

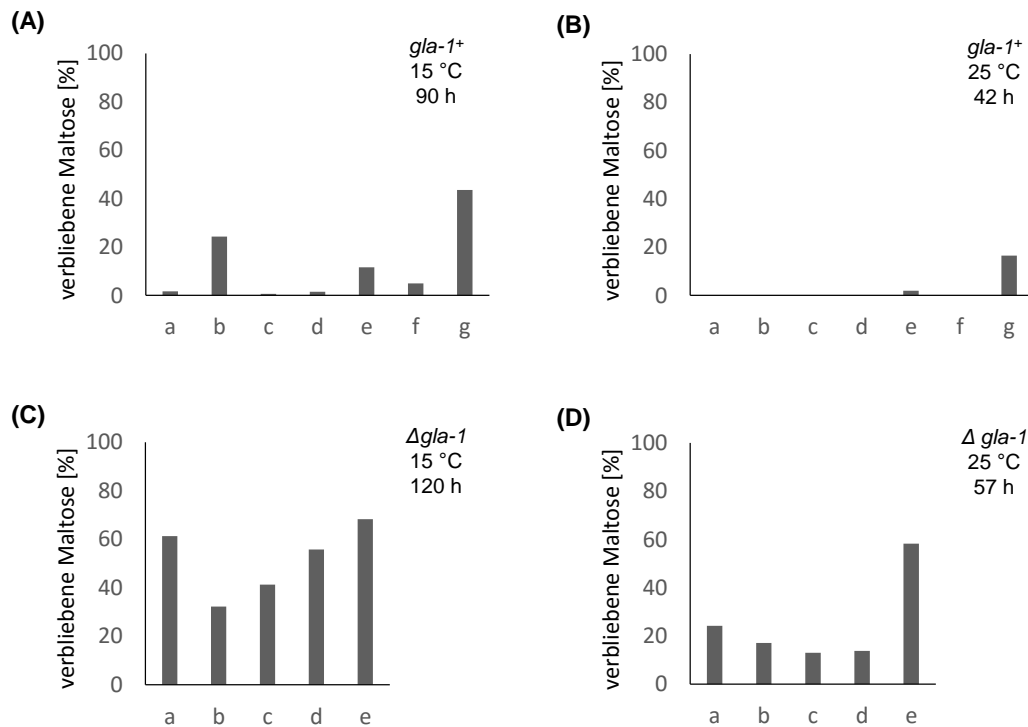


Abb. 3.17: Bei Produktionsstämmen von GLA₁-HT186 mit *gla-1*-Deletion konnten bei Ernte noch signifikante Mengen an Maltose detektiert werden, bei *gla-1⁺*-Stämmen war diese aufgebraucht. (A) und (B) beinhalten die Daten der Kultivierungen der Stämme mit *gla-1⁺*-Hintergrund, in (C) und (D) wurden Stämme mit Δ *gla-1*-Hintergrund kultiviert. Erntezeitpunkte und Kultivierungstemperaturen sind der jeweiligen Grafik zu entnehmen. Bei (A) und (B) wurden exakt die gleiche Reihenfolge und Stämme aus Abb. 3.14 verwendet, bei (C) und (D) sind nähere Stamminformationen in Abb. 3.15 zu finden.

In fast allen Stämmen mit *gla-1⁺*-Hintergrund (A, B) war das Substrat fast vollständig verbraucht. Beim Kontrollstamm DHN-169 (*his-3⁺*, Δ *vib-1*, Δ *vvd*, *exo-1*; Abb. 3.17 A und B, e), bei welchem während der Kultivierung stellvertretend für alle Kulturen die Substratkonzentration gemessen wurde, konnten noch Reste nachgewiesen werden. Die Kulturen der Stämme mit Δ *gla-1*-Hintergrund hatten alle noch Substrat zur Verfügung. Dies bedeutet, dass sie sich noch in einer anderen Wachstumsphase befanden. Ein Vergleich zwischen Proteaseaktivität und Substratkonzentration zeigt die Tendenz auf, dass je geringer die Substratkonzentration bei Ernte war, desto höher die Proteaseaktivität war (Tab. 3.1). Diese Tendenz kann allerdings nicht in jedem Einzelfall bestätigt werden. Unter bestimmten Bedingungen scheinen also Proteasen sekretiert zu werden, die das Produkt dann abbauen. Dies könnte der Grund sein, warum der Nachweis der Fusionsproteine hauptsächlich bei Stämmen mit Δ *gla-1*-Hintergrund gelangt, da diese noch nicht in der Absterbephase angelangt waren.

Tab. 3.1: Zusammenfassung der Produktionsüberprüfung von Stämmen mit dem genetischen Hintergrund *exo-1*, Δvvd , $\Delta vib-1$, $\pm \Delta gla-1$. Erläuterungen: CO: Codon-Optimierung von *ht186-d11*, WB: Western Blot (- kein Signal, +++ starkes Signal), BA: biomasseassoziiert, EZ: extrazelluläre Fraktion, Prot.: Proteaseaktivität (- keine Proteaseaktivität, +++ hohe Proteaseaktivität), Subs.: verbliebener Substratanteil bei der Ernte, Temp.: Temperatur

| Temp. | | <i>gla-1⁺, Δvib-1</i> | | | | | <i>Δgla-1, Δvib-1</i> | | | |
|-------|--------------|----------------------------------|-------------|---------------|------|-----|-----------------------|-------------|---------------|------|
| | Promotor | <i>Pgla</i> | <i>Pvvd</i> | <i>Pccg-1</i> | | | <i>Pgla</i> | <i>Pvvd</i> | <i>Pccg-1</i> | |
| | <i>exo-1</i> | <i>exo-1</i> | | | | WT | <i>exo-1</i> | | | |
| | CO | ja | ja | ja | nein | ja | ja | ja | ja | nein |
| 15 °C | WB, BA | + | ++ | +++ | ++ | +++ | + | ++ | +++ | + |
| | WB, EZ | - | - | - | - | - | - | + | +++ | + |
| | Prot. | ++ | +++ | ++ | ++ | - | + | +++ | + | + |
| | Subs. [%] | 2 | 24 | 1 | 1 | 44 | 61 | 32 | 41 | 56 |
| 25 °C | WB, BA | ++ | ++ | ++ | + | +++ | + | + | +++ | + |
| | WB, EZ | - | - | (+) | - | ++ | - | ++ | ++ | + |
| | Prot. | + | + | ++ | +++ | + | + | + | + | - |
| | Subs. [%] | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 24 | 17 | 13 | 14 |

Um herauszufinden, ob es sich bei der gemessenen Proteaseaktivität um ein zufällig auftretendes oder dauerhaftes Problem handelt, wurden Stämme kultiviert, welche die Mutationen *exo-1* und $\Delta vib-1$ in verschiedenen Kombinationen enthielten sowie einer der Produktionsstämme (Abb. 3.18). Bislang wurden 10 g/L Maltose im Minimalmedium verwendet. Da laborintern das Minimalmedium üblicherweise 20 g/L Saccharose enthält, sollten ab sofort ebenfalls 20 g/L Maltose eingesetzt werden (entspricht in beiden Fällen 58 mM). Dadurch könnte dann auch die Wachstumsphase verlängert werden, wodurch mehr Produkt erhalten wird. In regelmäßigen Abständen wurden Maltosekonzentration und Proteaseaktivität gemessen.

Beim Wildtyp war bereits nach 14 h Proteaseaktivität vorhanden (deutliche Nebenbande bei ca. 28 kD, Kontrolle zeigte diese Bande wesentlich schwächer auf). Nach 46 h war die Aktivität am stärksten (keinerlei Banden mehr auf Gel) und nahm anschließend wieder ab. Der gleiche Verlauf ist bei *exo-1* zu sehen, was zeigt, dass die *exo-1*-Mutation keinen Einfluss auf die Proteaseaktivität hat. Der $\Delta vib-1$ -Stamm zeigte bis 22 h nahezu keinerlei Proteaseaktivität. Nach 38 h stieg diese jedoch an und verblieb bis zum Ende auf gleich hohem Niveau. Gleiches gilt für den *exo-1* $\Delta vib-1$ -Stamm. Der Produktionsstamm zeigt dazu einen ähnlichen Verlauf, allerdings setzte die Proteaseaktivität bereits nach 38 h ein, sank im Anschluss jedoch wieder leicht ab. Bei allen Stämmen konnte also eine Proteaseaktivität nachgewiesen werden, jedoch zeigen Stämme mit der *vib-1*-Deletion diese erst wesentlich später auf.

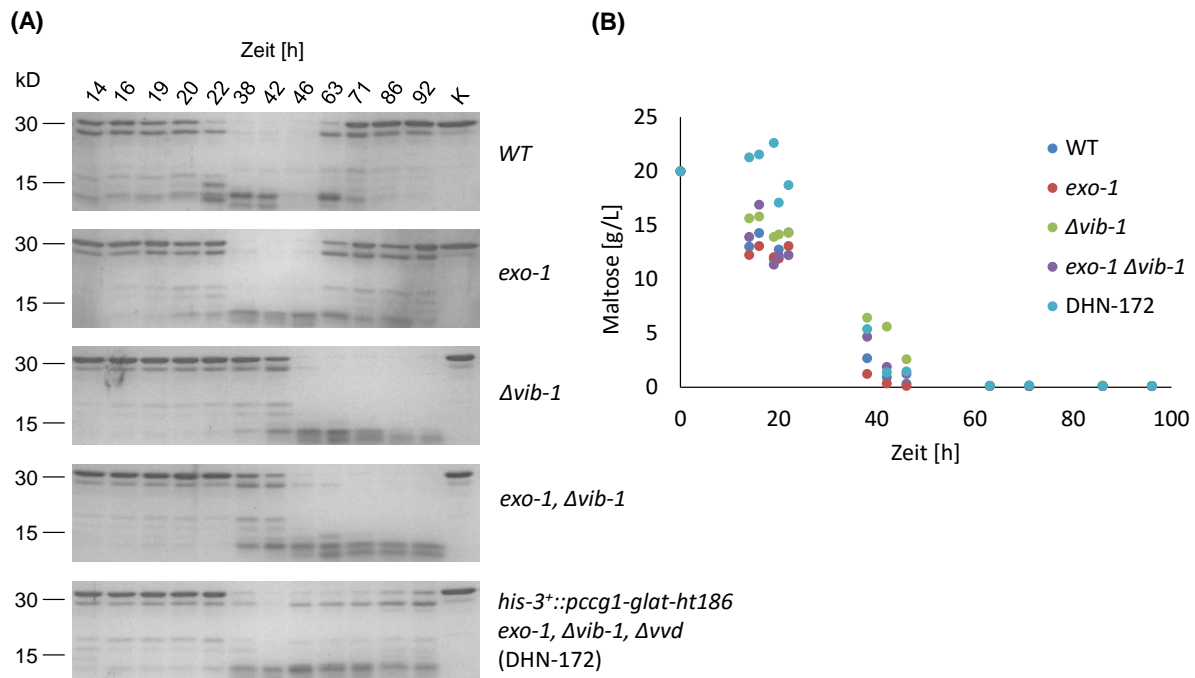


Abb. 3.18: Eine Limitierung der Zuckerquelle war nicht der Grund für die aufgetretene Proteaseaktivität bei Stämmen mit verschiedenem genetischen Hintergrund. Über einen Zeitraum von 92 h wurden in Minimalmedium mit Maltose (20 g/L) die fünf Stämme N1-01 (Wildtyp, WT), *exo-1*, Δ *vib-1*, *exo-1* Δ *vib-1* sowie der Produktionsstamm DHN-172 (*his-3⁺::Pccg-1-glat-ht186-13 \times myc*, Δ *vib-1*, Δ *vvd*, *exo-1*) kultiviert. Für den Proteaseaktivitäts-Assay (A) wurden Kulturüberstände mit HT186-D11 (produziert in *E. coli*, ca. 1 μ g) für 24 h bei 30 °C inkubiert. Als Kontrolle wurde der scFv mit PBS (K) inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Ein Fehlen der Bande bei 30 kD oder Abbauprodukte weisen auf eine Proteaseaktivität hin. Zu allen Zeitpunkten wurde die Konzentration von Maltose (B) über einen colorimetrischen Test vermessen, bei welchem reduzierende Ende nachgewiesen werden.

Der Substratverlauf war bei allen Stämmen sehr ähnlich. Beim Produktionsstamm schien die Substratkonzentration zunächst anzusteigen. Dies liegt darin begründet, dass beim verwendeten Test reduzierende Zuckerenden nachgewiesen werden. Bei Spaltung von Maltose zu Glucose entstehen aus einem reduzierenden Ende zunächst zwei, bevor der Pilz die Glucose aufnehmen kann. Daher muss die Kurve in einem bestimmten Zeitraum zunächst ansteigen. Der Vergleich von Proteaseaktivität und Substratkonzentration zeigt, dass bei allen Stämmen bei Einsetzen der Proteaseaktivität noch Substrat vorhanden war. Damit kann Substratmangel als alleinige Ursache für die Proteaseaktivität ausgeschlossen werden.

Die Einführung der *exo-1*-Mutation hat nicht zu einer Verbesserung der Produktion des Fusionsproteins geführt. Allerdings zeigen die Kulturen nun eine wesentlich homogenere Myzelverteilung auf, was die spätere Kultivierung in Rührreaktoren deutlich vereinfachen könnte. Mit dem Einbringen von Δ *vvd* konnte nun auch Fusionsprotein unter der Kontrolle des *vvd*-Promotors produziert werden. Damit konnte bei diesem Expressionssystem mittlerweile

mit den Promotoren *Pccg-1* und *Pvvd* heterologes Protein produziert werden. Die zu Beginn dieser Arbeit durchgeführte Codon-Optimierung des scFv-Gens hat sich als produktionssteigernd erwiesen. Die Verwendung von langsam wachsenden Stämmen mit $\Delta gla-1$ hat gezeigt, dass die Fusionsproteine zu einem bestimmten Zeitpunkt im Kulturüberstand nachzuweisen sind, anschließend jedoch durch Proteasen wieder abgebaut werden. Zum Abschluss dieses Abschnitts konnte gezeigt werden, dass unter den gewählten Kultivierungsbedingungen zwar $\Delta vib-1$ im Vergleich zum Wildtyp die Proteaseaktivität deutlich herabsetzt, zum Ende der Wachstumsphase diese jedoch wieder auftaucht. Die nächsten Schritte sollten sich daher mit den Ursachen der Proteaseaktivität befassen. Dabei sollte untersucht werden, warum zu Beginn dieser Arbeit bei $\Delta vib-1$ -Stämmen kaum Proteaseaktivität nachgewiesen werden konnte und sich dies geändert hat. Für die Untersuchung dieser Problematik sollten unter Verwendung von einem Produktionsstamm Kultivierungen in Rührreaktoren durchgeführt werden, da im Gegensatz zu Schüttelkolben die Kultivierungsbedingungen besser kontrolliert werden können.

3.4 Prozessoptimierung in einem parallelen Bioreaktorsystem

3.4.1 Allgemeines

Nachdem im vorangegangenen Abschnitt geeignete Produktionsstämme generiert wurden und gezeigt wurde, dass im Schüttelkolbenmaßstab unter bestimmten Bedingungen heterologes Protein produziert wird, sollte der Produktionsmaßstab vergrößert werden (sogenanntes *Scale-Up*). Dazu wurde die Produktion in einem 1 L-Bioreaktorsystem untersucht. Der Vorteil bei der Kultivierung in einem Bioreaktorsystem besteht in den regulierten Kultivierungsbedingungen. So können mittels Regelungstechnik der Gelöstsauerstoffgehalt (DO, *dissolved oxygen*) und der pH-Wert kontrolliert und gleichzeitig kann eine Abgasanalyse durchgeführt werden. Dadurch lässt sich durch einfache Mittel der Zustand der Kulturen bestimmen und feststellen, wann die Kultur limitiert ist und abstirbt. Dies erleichtert erheblich die Prozessoptimierung. Ziel der Optimierung ist ein Prozess, bei welchem die Proteaseaktivität am geringsten und die Ausbeute am höchsten ist.

In Abschnitt 3.3.3 wurde gezeigt, dass prinzipiell mit allen drei getesteten Promotoren *Pgla*, *Pvvd* und *Pccg-1* Fusionsprotein produziert werden kann. Der extrazelluläre Nachweis im Kulturüberstand gelang dabei lediglich in Verbindung mit *Pvvd* und *Pccg-1*. Die höchsten nachgewiesenen Mengen an Produkt konnten bei Stämmen mit $\Delta gla-1$ -Hintergrund erbracht

werden. Dies lag aber vermutlich am langsamen Wachstum und dadurch an einer verspäteten Phase der Proteasesekretion. Zu diesem Zeitpunkt wird daher davon ausgegangen, dass *Δgla-1* nicht direkt die Produktion beeinflusst.

Für die kommenden Versuche sollte exemplarisch nur ein Stamm verwendet werden. Aufgrund des langsamen Wachstums von Stämmen mit *Δgla-1*-Hintergrund sollte auf diese Deletion verzichtet werden. Als Promotor wurde *Pvvd* verwendet. Obwohl in Verbindung mit *Pccg-1* mehr Protein produziert wurde, lag die Vermutung nahe, dass der *ccg-1*-Promotor unter den gewählten Bedingungen im Bioreaktor reprimiert sein könnte (Umrath, 2015). Bei konstanter Beleuchtung führt der *vvd*-Promotor dauerhaft zur Proteinexpression und daher zur wachstumsgekoppelten Proteinproduktion, welche bei diesen Versuchen erwünscht ist. Für die Prozessoptimierung wurde daher ausschließlich der Stamm DHN-201 (*his-3⁺::Pvvd-glat-ht186-13×myc, exo-1, Δvib-1, Δvvd*) verwendet.

In der Masterarbeit von Felix Umrath konnten wichtige Erkenntnisse über den Kultivierungsverlauf von *N. crassa* im parallelen Bioreaktorsystem gewonnen werden (Umrath, 2015). Auf diesen Erkenntnissen baut diese Arbeit auf.

Die wichtigsten regulierten Kultivierungsparameter sind hierbei der Gelöstsauerstoffgehalt (DO) und der pH-Wert der Kultur. Ziel der Regulierung der Gelöstsauerstoffkonzentration ist, dass dieser Wert nicht unter 20 % des Anfangswertes fällt. Dies wird durch die Rührgeschwindigkeit erreicht. Fällt dieser Wert unter den Schwellenwert, so wird sukzessiv die Rührergeschwindigkeit (N) erhöht. Dadurch bleibt bis zum Absterben der Kultur der Gelöstsauerstoffwert konstant bei 20 % und eine Limitierung durch Sauerstoff ist ausgeschlossen.

Der optimale pH-Wert bei submersen Kultivierungen von *N. crassa* wird in der Literatur nicht beschrieben. Das höchste Längenwachstum von Hyphen hingegen ist bekannt und liegt bei einem pH-Wert von 4,5 (Ruoff *et al.*, 2000). Der pH-Wert sinkt bei einer *N. crassa*-Kultivierung in Vogel's Minimalmedium ab. Dieser Effekt wird dazu genutzt, um den pH-Wert 4,5 zu erreichen. Danach wird dieser pH-Wert durch Zugabe einer Lauge (hier 12,5 %ige Ammoniaklösung) konstant gehalten. Eine zusätzliche Regulation mit Säure erfolgte nicht, wodurch pH-Werte oberhalb des eingestellten pH-Wertes erreicht werden können.

Der Vorteil eines regulierten Bioreaktorsystems gegenüber Kultivierungen in Schüttelkolben ist die Ausgabe von Online-Daten, wodurch zu jedem Zeitpunkt der Zustand der Kultur bekannt ist. Die wichtigsten Online-Daten sind hierbei die Abgasdaten wie Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidgehalt der Abluft.

Durch den Aufbau des Reaktorsystems ist eine monoseptische Beprobung möglich. Dadurch kann durch einfache Weise die Biotrockenmasse bestimmt und Kulturüberstand gewonnen werden, der zum Beispiel für die Analyse der Proteaseaktivität oder Produktgehalt herangezogen werden kann.

3.4.2 Vergleich von Glucose und Maltose als Kohlenstoffquelle

Zunächst wurden nacheinander Kultivierungen mit Minimalmedium mit Glucose oder Maltose (je 20 g/L) durchgeführt. Kultiviert wurde bei 30 °C und konstanter Beleuchtung mit einer Lichtquelle mit kontinuierlichem Spektrum (Abb. 3.19).

Beide Kultivierungen zeigten einen typischen Ablauf einer *N. crassa*-Kultivierung in einem Bioreaktor. Dabei war das Wachstum auf Glucose als C-Quelle wesentlich schneller als auf Maltose. Direkt nach dem Animpfen sank der Gelöstsauerstoffwert (DO-Wert). Bei Wachstum auf Maltose stieg der DO-Wert anschließend wieder leicht an und sank schließlich wie bei Wachstum auf Glucose auf 20 % ab. Ab diesem Zeitpunkt setzte die DO-Regulation ein und die Rührerdrehzahlen stiegen an, um den DO-Wert auf 20 % konstant zu halten. Bei Glucose war der Anstieg der Drehzahl wesentlich höher als bei Maltose und erreichte auch fast doppelt so hohe Spitzenwerte. Nach Erreichen dieses Wertes sank die Rührerdrehzahl wieder ab und näherte sich dem Ausgangswert. Bei Glucose stieg der DO-Wert anschließend kurz an und fiel erneut auf 20 %. Bei Maltose blieb der Wert konstant auf dem Regulationswert. Bei beiden Kulturen sank der pH-Wert mit der Zeit ab und wurde anschließend mittels Lauge auf pH 4,5 reguliert. Zum Ende der Kultivierung stieg der pH-Wert wieder an, da auf eine zusätzliche Regulation mit Säure verzichtet wurde. Bei Glucose setzte die Regulation zu einem früheren Zeitpunkt ein und die Regulationsphase war wesentlich kürzer als bei Maltose. Gleichzeitig mit dem Absinken der Rührerdrehzahl stieg der pH-Wert an und erreichte höhere Werte als zu Kultivierungsbeginn. Bei beiden Kulturen wurde durch die Regulation die gleiche Menge an Lauge hinzugegeben, allerdings ist die Steigung bei der Kultivierung auf Glucose wesentlich höher als auf Maltose. Auch die Abgasdaten bestätigen die allgemeine Tendenz. Der Sauerstoffanteil in der Abluft zeigt eindeutig ein aerobes Wachstum auf, da dieser Anteil mit der Kultivierungszeit immer geringer wurde. Der Tiefpunkt dieser Kurve ist zum gleichen Zeitpunkt wie der Hochpunkt der Rührerdrehzahlkurve. Auch bei den CO₂-Anteilen ist die gleiche Tendenz zu sehen. Der Anteil stieg bis zu einem Maximalwert exponentiell an und fiel gleichzeitig mit der Rührerdrehzahl ab.

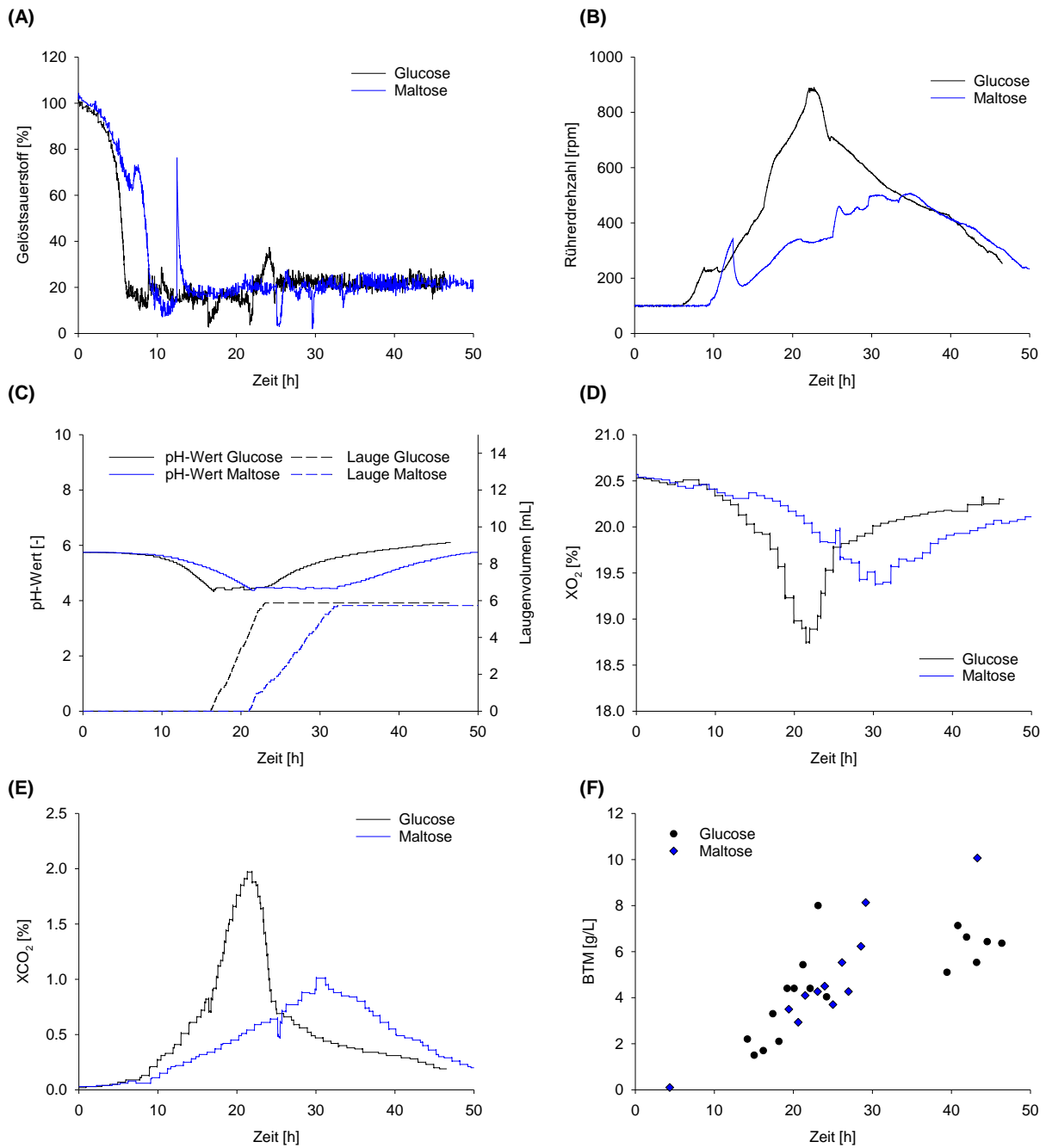


Abb. 3.19: Mit Glucose als C-Quelle verlief das Wachstum schneller als mit Maltose. Der Stamm DHN-201 (*his-3⁺::P_{vvd}-glat-ht186-13×myc, exo-1, Δvib-1, Δvvd*) wurde in einem regulierten 1 L-Bioreaktorsystem (800 ml Arbeitsvolumen) in zwei verschiedenen Zeiträumen bei 30 °C kultiviert. Der Gelöstsauerstoffwert (A) wurde bei Erreichen von 20 % konstant gehalten und der Startwert der Rührerdrehzahl (B) betrug 100 rpm. Der pH-Wert (C) wurde mit einer 12.5 %igen Ammoniaklösung auf 4,5 geregelt. Der Anteil von Sauerstoff (D) und Kohlenstoffdioxid (E) in der Abluft wurde gemessen. Die Biotrockenmasse (F) wurde ebenfalls bestimmt. Die Reaktoren wurden durchgehend mit einer Lichtquelle bestrahlt, um den *vvd*-Promotor zu aktivieren.

Es gibt also eine eindeutige Korrelation zwischen Rührerdrehzahl, pH-Wert sowie den Abgasdaten, die genau den Zeitpunkt einer Limitierung der Kultur aufzeigen, die anschließend zum Absterben der Kultur führt. Auch die Entwicklung der Biotrockenmasse zeigte zwar einen ähnlichen Verlauf, aber auch hier stiegen die Werte der Kultivierung auf Glucose wesentlich schnell an und es ist damit zu rechnen, dass die End-Werte gleich waren. Die Auswertung von Biotrockenmasse ist bei Pilzkulturen tendenziell problematisch, da eine perfekte Homogenität aufgrund des Myzelwachstums nahezu unmöglich und dadurch die Probenahme fehlerbehaftet ist. Dies erklärt die Schwankungen in den Biomassenverläufen. Bei Maltose war die Kulturbrühe wesentlich homogener (Abb. 3.20), wodurch die Schwankungen bei den Biomassewerten wesentlich geringer sind.

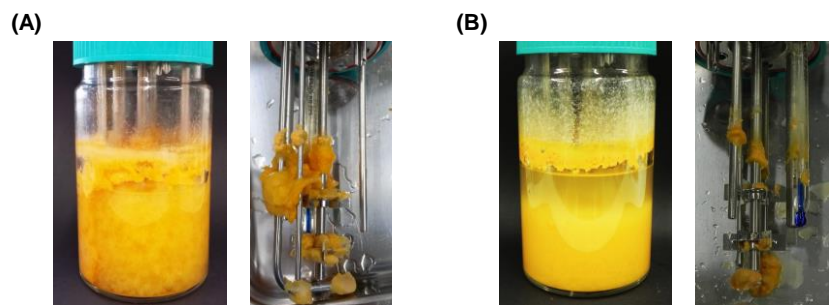


Abb. 3.20: Kulturen mit Maltose als C-Quelle waren wesentlich homogener als Kulturen mit Glucose. Der Stamm DHN-201 (*his-3⁺::Pvvd-glat-ht186-13×myc, exo-1, Δvib-1, Δvvd*) wurde in einem regulierten 1 L-Bioreaktorsystem kultiviert. Abgebildet sind die Reaktoren nach Beenden der Kultivierungen auf Glucose (A) und Maltose (B). Bei Glucose sind mehr zusammenhängende Myzelbestandteile zu erkennen. An den Bauteilen hat sich in beiden Fällen Myzel abgesetzt.

An den eingetauchten Bauteilen und Sonden des Reaktors setzte sich in beiden Fällen Myzel ab, allerdings waren die Reste bei Glucose viel größer. Insbesondere die Rührblätter waren komplett zugesetzt.

Der Kulturüberstand wurde auf Anwesenheit des Produktes und Proteasen analysiert (Abb. 3.21).

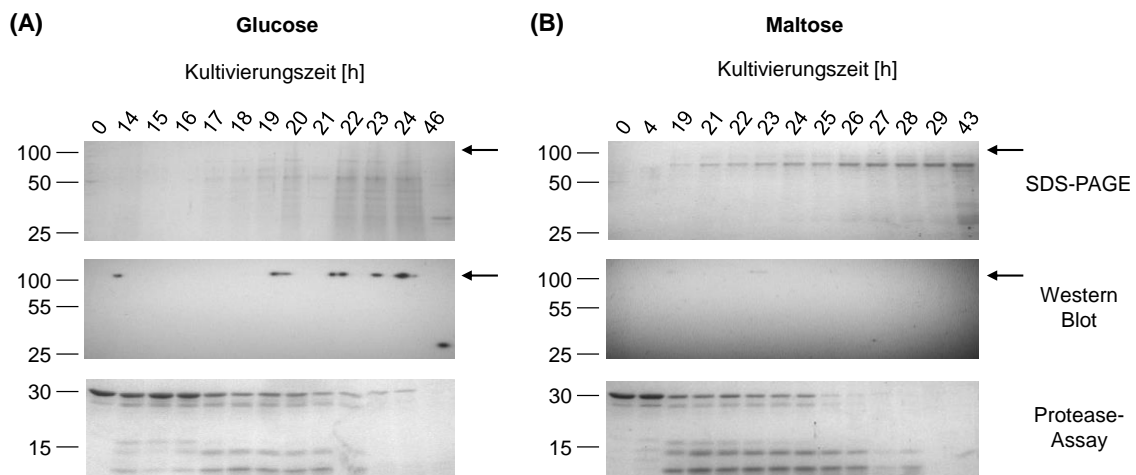


Abb. 3.21: Nur geringe Mengen an Fusionsprotein konnten in Kultivierungen von DHN-201 (*his-3⁺::Pvvd-glat-ht186-13×myc, exo-1, Δvib-1, Δvvd*) in Minimalmedium mit Glucose (A) und Maltose (B) nachgewiesen werden. Kultiviert wurde in einem regulierten 1 L-Bioreaktorsystem. Proteine aus dem Kulturüberstand wurden gefällt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und über Coomassie-Färbung analysiert. In einem Western Blot wurde der *myc-tag* des Fusionsproteins detektiert. Die Entwicklung erfolgte mittels ECL-Methode (Belichtung des Filmes für 2 min). Für den Protease-Assay wurden ungefällte Kulturüberstände mit HT186-D11 (produziert in *E. coli*, ca. 1 µg) für 24 h bei 30 °C inkubiert. Als Kontrolle wurde der scFv mit Medium (0) inkubiert. Anschließend wurden die Proben in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Ein Fehlen der Bande bei 30 kD weist auf eine Proteaseaktivität hin.

Sowohl bei Glucose als auch Maltose als C-Quelle konnte mit DHN-201 in Minimalmedium kaum Fusionsprotein produziert bzw. nachgewiesen werden. Der wahrscheinliche Grund für den fehlenden Nachweis liegt in der Proteaseaktivität, welche im Überstand vorherrschte. Dadurch konnte zu einigen unregelmäßigen Zeitpunkten bei Glucose das vollständige Produkt oder Abbauprodukte (nach 46 h) nachgewiesen werden. Bei Maltose wurden schwache Signale nur nach 19 h und 23 h detektiert. Aufgrund dieser Ergebnisse sollte der Fokus der Auswertung bei kommenden Versuchen auf die Proteaseaktivität gelegt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass der Pilz generell in der Lage ist, das Fusionsprotein zu produzieren und zu sekretieren, die ebenfalls sekretierten Proteasen führten jedoch unmittelbar zum Abbau des Produktes. Die Proteaseaktivität hängt dabei nicht von der verwendeten C-Quelle ab. Der Schlüssel zur erfolgreichen Produktion des Fusionsproteins lag daher in der Entwicklung eines Prozesses, bei dem keine Proteasen mehr sekretiert werden bzw. die Proteaseaktivität minimiert ist. Für die systematische Untersuchung dieser Fragestellung, wurden parallele Kultivierungen im 1 L-Bioreaktorsystem mit dem Stamm DHN-201 und Maltose als C-Quelle durchgeführt. Der Vorteil bei der Verwendung von Maltose liegt in der Homogenität der Kultursuspension und daher in einer besseren Reproduzierbarkeit der Kultivierungen durch eine homogenere Probenahme (zum Beispiel bei der Bestimmung der Biomasse).

In einem ersten Schritt sollte überprüft werden, ob Limitierungen der Stickstoffquelle im Medium der Grund für die Proteaseaktivität sein könnten, da vorangegangene Schüttelkolbenversuche gezeigt hatten, dass Proteaseaktivität bereits vor Erschöpfen der C-Quelle auftritt.

3.4.3 Einflusses des Stickstoffgehaltes im Medium auf die Proteaseaktivität

Die Hauptursache für die Sekretion von Proteasen bei *N. crassa* ist die Limitierung der Quellen von Kohlenstoff, Stickstoff und Schwefel (Cohen & Drucker, 1977; Cohen *et al.*, 1975; Lindberg *et al.*, 1982). In diesem Abschnitt sollten die Kohlen- und Stickstoffquelle untersucht werden. Dazu sollte Minimalmedium mit verschiedenen Ammoniumkonzentrationen verglichen werden bei gleicher Konzentration der C-Quelle. Bisher wurde Vogel's Minimalmedium verwendet. Das Problem an diesem Medium ist allerdings, dass als Stickstoffquelle Ammoniumnitrat verwendet wird (Vogel, 1956) und damit zwei Stickstoffquellen in einem Salz vorhanden sind. In diesem Versuch sollte allerdings nur die Ammoniumkonzentration verändert werden. Abgeleitet vom Vogel's Minimalmedium wurde das sogenannte Bird Medium entwickelt (Metzenberg, 2004). Dieses enthält nur noch Ammoniumchlorid und keinerlei Nitrat mehr, die restliche Zusammensetzung ist sehr ähnlich zu Vogel's Minimalmedium (siehe Material und Methoden). Das Wachstumsverhalten in Vogel's und Bird Medium ist nahezu identisch (Metzenberg, 2004).

Für die Untersuchung, ob Ammoniumlimitierung zu einer Sekretion der Proteasen führt, wurden Kultivierungen mit Maltose mit dem Stamm DHN-201 in Bird Medium mit Ammoniumkonzentrationen zwischen 25 und 100 mM durchgeführt. Damit dem System kein weiterer Stickstoff zugeführt wird, wurde bei der pH-Wert-Regulierung als Lauge Natriumhydroxid anstatt Ammoniak verwendet. Der Verlauf der Ammonium- sowie Maltosekonzentration wurde bestimmt (Abb. 3.22).

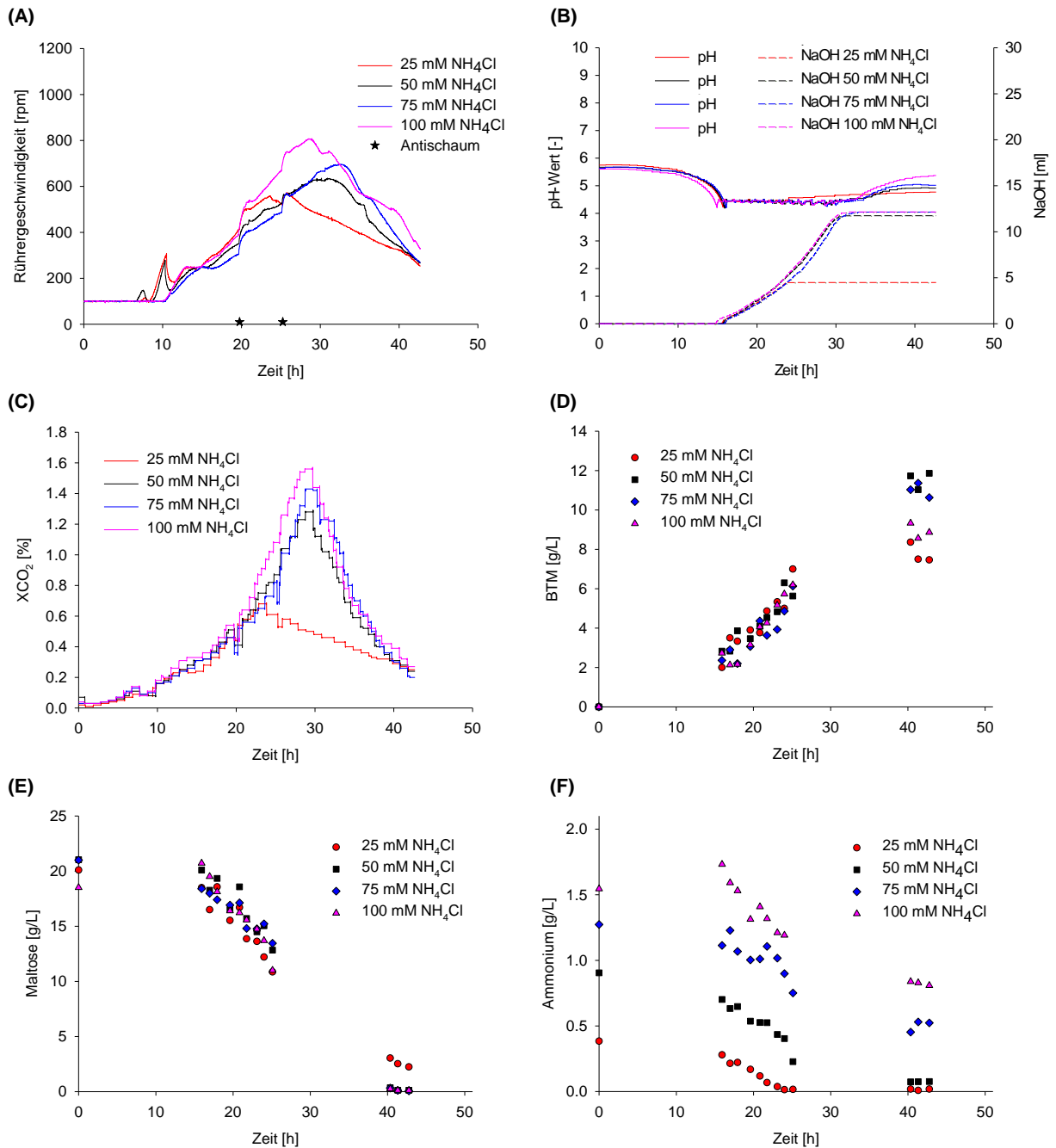


Abb. 3.22: Bird Medium mit standardmäßiger Ammoniumkonzentration von 25 mM führte zu früherem Absterben der Kultur durch Limitierung der Stickstoffquelle. Der Stamm DHN-201 (*his-3⁺::Pvvd-glat-ht186-13×myc, exo-1, Δvib-1, Δvvd*) wurde in einem regulierten parallelen 1 L-Bioreaktorsystem (800 ml Arbeitsvolumen) bei 30 °C in Bird Medium mit vier verschiedenen Ammoniumkonzentrationen kultiviert. Der Gelöstsauerstoffwert wurde bei Erreichen von 20 % durch Regulation der Rührerdrehzahl konstant gehalten (A). Der pH-Wert (B) wurde mit einer 2 M NaOH-Lösung auf pH 4,5 geregelt. Der Anteil von Kohlenstoffdioxid (C) in der Abluft wurde gemessen. Durchgeführte Offline-Analysen waren die Bestimmung von Biotrockenmasse (D), Maltose-Konzentration (E) und Ammoniumkonzentration (F). Die Reaktoren wurden durchgehend mit einer Lichtquelle bestrahlt, um den *vvd*-Promotor zu aktivieren.

Den Online-Daten ist eindeutig zu entnehmen, dass die Ammoniumkonzentration von 25 mM nicht für die Verwertung der gesamten C-Quelle ausreichte. Bereits nach 23 h sank sowohl die Rührerdrehzahl als auch der Anteil von CO₂ in der Abluft. Der pH-Wert stieg ebenfalls zum gleichen Zeitpunkt an und die pH-Regulation setzte aus. Dieser Zeitpunkt korreliert mit dem Erschöpfen des Ammoniums, Maltose war zu diesem Zeitpunkt allerdings noch ausreichend vorhanden (> 10 g/L). Auch bei Abbruch der Kultivierung war noch Maltose vorhanden (ca. 2 g/L). Die zugegebene Menge an NaOH betrug lediglich 40 % im Vergleich zu den anderen drei Kulturen. Bei den übrigen drei Ammoniumkonzentrationen waren keine signifikanten Unterschiede in der Abluft oder der Rührerdrehzahl zu erkennen. Jedoch scheint der maximale Anteil an CO₂ mit steigender Ammonium-Anfangskonzentration minimal anzusteigen. Der pH-Wert-Verlauf sowie die Zugabe an NaOH waren nahezu identisch. Die Entwicklung der Biomasse war bei allen vier Kulturen gleich. Die Endkonzentration der Biomasse zeigte nach 40 h keine eindeutige Tendenz, bei welcher Ammoniumkonzentration die meiste Biomasse erzeugt wurde. Ausgehend von der Erfahrung aus nicht gezeigten Kultivierungen ist davon auszugehen, dass sich die Biomasse in der Absterbephase wieder verringerte und somit die maximale Biomasse nicht erfasst werden konnte.

Der Verlauf der Maltosekonzentration war ebenfalls sehr ähnlich. Die Verläufe der Ammoniumkonzentration hatten alle die gleiche Tendenz. Da die Anfangswerte aber unterschiedlich waren, waren dementsprechend auch die Endwerte dieser Konzentrationen unterschiedlich. Ausgehend aus der Differenz von Ausgangs- und Endwert wurde berechnet, dass für eine Kultivierung mit 20 g/L Maltose eine Ammoniumkonzentration von mindestens 50 mM benötigt wird (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Berechnung der benötigten Anfangskonzentration von Ammonium in Bird Medium mit 20 g/L Maltose. Aus den Anfangs- und Endwerten der Ammoniumkonzentration wurden die absoluten verbrauchten Ammoniummengen berechnet. Daraus wurden der Ertragskoeffizienten für die Bildung der Biomasse auf Basis der Stickstoffquelle $Y (X/NH_4^+)$ sowie der Verbrauchskoeffizient von Ammonium auf Basis des Substrats $C (NH_4^+/Substrat)$ berechnet. Aus diesen Daten wurde die benötigte Anfangskonzentration von Ammonium ausgehend von jeder Kultivierung bestimmt.

| NH₄⁺-Konz. [mM] | NH₄⁺ Verbrauch [g] | NH₄⁺ verblieben [%] | Y (X/NH₄⁺) [g_{BTM} / g_{NH₄⁺]} | C (NH₄⁺/Substrat) [g_{NH₄⁺ / g_{Substrat}]} | benötigte Konz. [mM] |
|--|---|--|--|--|-------------------------------------|
| 50 | 0,78 | 9 | 12,3 | 0,039 | 54 |
| 75 | 0,75 | 38 | 12,6 | 0,037 | 52 |
| 100 | 0,72 | 51 | 13,1 | 0,036 | 50 |
| Mittelwert | 0,75 | - | 12,7 | 0,037 | 52 |

Ausgehend von den Ergebnissen dieses Versuches, liegt die minimale Ammoniumkonzentration bei ca. 50 mM. Da bei der Produktion von Proteinen ein erhöhter Bedarf an Stickstoff vorliegt (Tripathi, 2009), sollte die Konzentration höher liegen und wurde auf 65 mM festgelegt. Bei der Definition des neuen Mediums wurde außerdem Ammoniumchlorid gegen Ammoniumsulfat ausgewechselt. Dies geschah aus zwei Gründen. Zum einen werden bei der Verwendung von Edelstahlreaktoren (welche zum Abschluss dieser Arbeit verwendet werden sollen) hohe Chloridionenkonzentrationen vermieden, da dies die Korrosionsgefahr erhöht (Junker, 2009; Ryan *et al.*, 2002). Zum anderen ist die Rolle der Schwefelkonzentration nicht geklärt. Mit dem Umstieg auf Ammoniumsulfat wurde die Konzentration der Schwefelquelle drastisch erhöht, wodurch in weiteren Versuchen ein Mangel ausgeschlossen werden kann. Aufgrund der stöchiometrischen Zusammensetzung von Ammoniumsulfat ((NH₄)₂SO₄) enthielt das neue Medium 32,5 mM Ammoniumsulfat und wird im weiteren Verlauf nur noch als optimiertes Bird Medium bezeichnet.

Von allen Kulturüberständen wurde die Proteaseaktivität mit dem SDS-PAGE-Assay bestimmt und mit der Software ImageJ grafisch ausgewertet (Abb. 3.23).

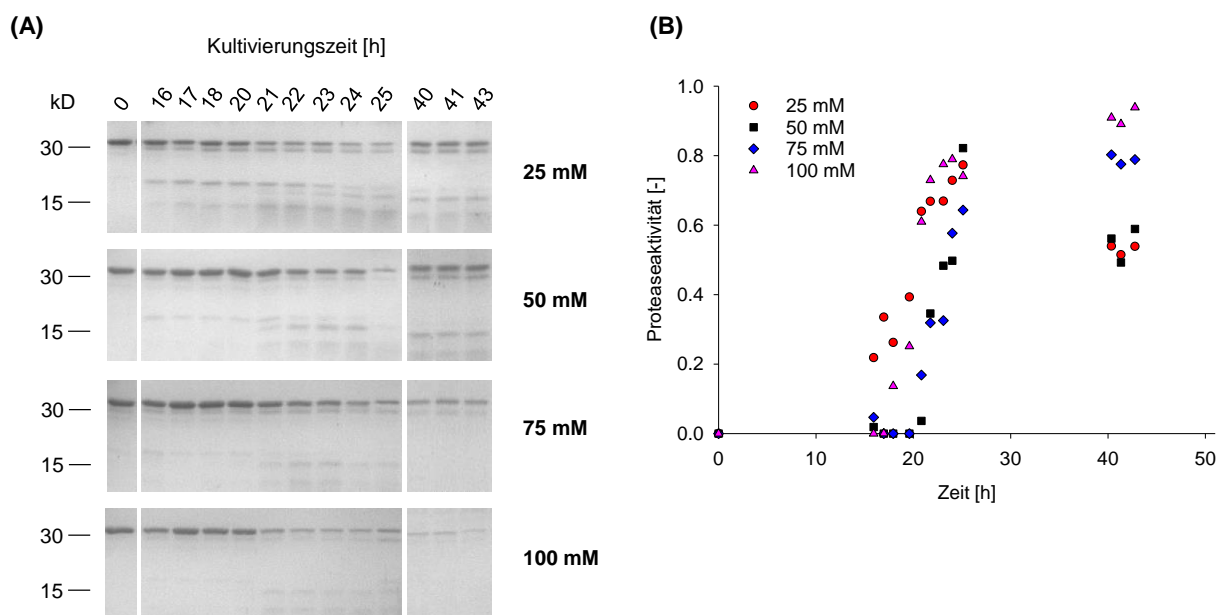


Abb. 3.23: Höhere Ammoniumkonzentrationen führten nicht zum Herabsinken der Proteaseaktivität. Verwendet wurden die Kulturüberstände aus der Kultivierung mit verschiedenen Ammoniumkonzentrationen (25 – 100 mM NH₄Cl). Für den Protease-Assay (A) wurden ungefällte Kulturüberstände mit HT186-D11 (produziert in *E. coli*, ca. 1 µg) für 24 h bei 30 °C inkubiert. Als Kontrolle wurde der scFv mit Medium (0) inkubiert. Anschließend wurden die Proben in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Ein Fehlen der Bande bei 30 kD weist auf eine Proteaseaktivität hin. Die Gele wurden grafisch mit der Software ImageJ ausgewertet und die Proteaseaktivität berechnet (B). Dafür wurden die Intensitäten der Banden bei ca. 30 kD bestimmt und mit der Kontrolle verglichen.

Obwohl das Medium mit 25 mM Ammoniumchlorid einen zu niedrigen Stickstoffgehalt enthielt, konnte mit Erhöhen dieser Konzentration nicht die Proteaseaktivität in der Wachstumsphase verhindert werden. In der Absterbephase führte eine hohe Ammoniumkonzentration zu einer höheren Proteaseaktivität als im Mangelmedium. Es kann ausgeschlossen werden, dass ein Mangel an Stickstoff und Kohlenstoff die alleinigen Ursachen für die Sekretion der Proteasen waren, da bei den Kulturen mit 50 – 100 mM Ammoniumchlorid zum Zeitpunkt des Einsetzens der Aktivität (nach ca. 21 h) sowohl ausreichend Maltose als auch Ammonium vorhanden war. Für eine Korrelation mit den Messdaten wurde zunächst die spezifische Proteaseaktivität berechnet (Proteaseaktivität bezogen auf die Biomasse), um die Kulturen besser vergleichen zu können. Anschließend sollte überprüft werden, ob die pH-Wert-Regulation der Grund für die Proteaseaktivität sein könnte (Abb. 3.24).

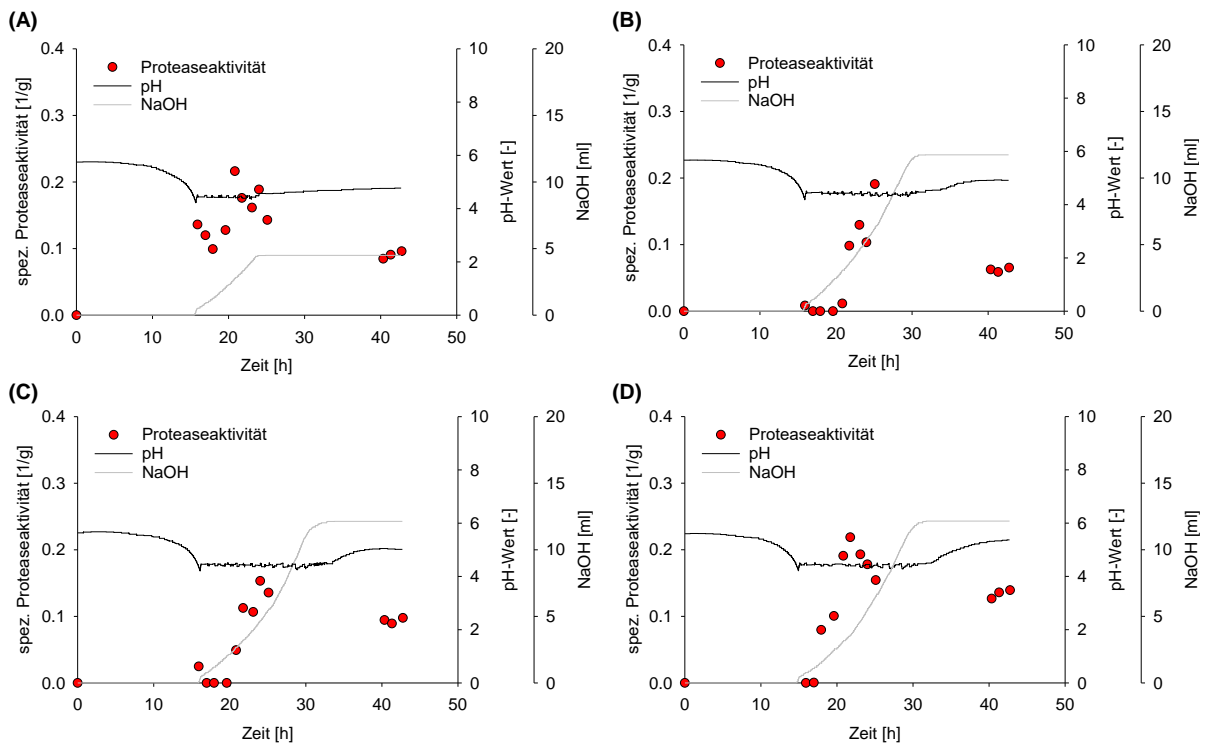


Abb. 3.24: Der Beginn der spezifischen Proteaseaktivität korreliert mit dem Einsetzen der pH-Wert-Regulation und Erreichen des pH-Wertes 4,5. Die Inhalte dieser Abbildung basieren auf den Daten von Abb. 3.22 und Abb. 3.23. Verwendet wurden die Daten der pH-Wert-Regulierungen der Kultivierungen in Bird Medium mit 25 mM (A), 50 mM (B), 75 mM (C) und 100 mM (D) Ammoniumchlorid.

Bei den Kultivierungen ohne Stickstofflimitierung (Abb. 3.24 B-D) wiesen die Verläufe der spezifischen Proteaseaktivität immer ein Maximum nach ca. 20 h auf. Der Anstieg der Verläufe setzte immer gleichzeitig mit dem Beginn der pH-Wert-Regulation und Erreichen des

pH-Wertes 4,5 ein. Es wäre daher möglich, dass die Sekretion der Proteasen eine Antwort auf den pH-Wert bzw. eine Stressantwort auf das Eingreifen der Regulation in den pH-Wert war. Diese gesamte Kultivierung wurde wiederholt und führte zu den gleichen Ergebnissen (Daten nicht gezeigt). Dabei wurde bestätigt, dass die Biomasse in der Absterbephase klar abnimmt. Um zu überprüfen, ob der pH-Wert der Grund für die Proteaseaktivität im Kulturüberstand war, wurden in den nächsten Versuchen Kultivierungen mit verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Das Ziel sollte sein, eine pH-Wert-Führung zu etablieren, bei welcher die Proteaseaktivität minimal ist.

3.4.4 Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes auf die Proteaseaktivität

3.4.4.1 Kultivierung ohne pH-Wert-Regulierung sowie pH-Werte 4,5 – 5,7

Das parallele Bioreaktorsystem eignet sich zur systematischen Untersuchung des möglichen Einflusses des pH-Wertes auf die Proteaseaktivität. Der Vorteil dieses Systems ist die Möglichkeit, in jedem der vier Reaktoren einen anderen pH-Wert einzustellen und ggf. zu regeln.

Als erstes sollte überprüft werden, ob das Einsetzen der Regulation oder ein bestimmter pH-Wert der Grund für den Anstieg in der spezifischen Proteaseaktivität darstellen. Hierfür wurde eine Kultivierung ohne Regulation durchgeführt. Bei den übrigen drei Reaktoren wurden die pH-Werte auf 4,5, 5,1 und 5,7 durch Zugabe von NaOH als Lauge reguliert. Der pH-Wert 4,5 dient als Vergleich zu den bereits durchgeführten Kultivierungen, mit pH 5,7 wird der Ausgangszustand (Anfangs-pH-Wert des Mediums bei ca. 5,7) nahezu konstant gehalten. Mit pH 5,1 wurde ein pH-Wert gewählt, welcher mit gleichen Abstand zwischen pH 4,5 und 5,7 liegt. Zur Beurteilung der Kultivierung werden bei den Online-Daten nur stellvertretend die Anteile und Gesamtmenge an CO₂ (XCO₂) in der Abluft sowie der pH-Wert-Verlauf gezeigt, da sämtliche Informationen diesen Daten entnommen werden können (Abb. 3.25). Zum ersten Mal wurde das optimierte Bird Medium mit 32,5 mM Ammoniumsulfat verwendet. Die Proteaseaktivität der Kulturen wurde bestimmt (Abb. 3.25 E, F). Damit alle Ergebnisse vergleichbar sind, wurde eine Normierung der Aktivität auf die Biomasse vorgenommen (spezifische Proteaseaktivität) und die Aktivität nicht mehr zeitlich verglichen, sondern bezogen auf die gebildete CO₂-Menge.

Alle Graphen der Kultur bei pH 4,5 deuten darauf hin, dass die Optimierung des Mediums keine negativen Einflüsse hatte, da die Verläufe aller Messgrößen denen beim Bird Medium und Vogel's Medium entsprechen.

Durch die fehlende pH-Wert Regulation erreichte die entsprechende Kultur einen pH-Wert von 2,8. Unter diesen Bedingungen scheint *N. crassa* nicht mehr wachsen zu können und stirbt ab. Zu diesem Zeitpunkt lagen noch ca. 13 g/L Maltose vor (Daten nicht gezeigt), was 65 % der C-Quelle entspricht. Am Biomasseverlauf dieser Kultur wurde nochmals bestätigt, dass absterbende Kulturen lysieren und dadurch die Abnahme der Biomassekonzentration begründet liegt.

Der pH-Wert-Verlauf war bei den Kulturen mit normalem Wachstumsverhalten zunächst identisch, was eine gute Reproduzierbarkeit aufzeigte. Beim jeweiligen Erreichen des entsprechenden Regelwertes setzte die pH-Regulation ein, so dass die pH-Werte bis zum Zeitpunkt des Absterbens konstant blieben. Die Menge an zugegebener Lauge war bei allen Kulturen identisch. Die Biomasseentwicklung war bei allen drei Kulturen fast gleich, allerdings wurden bei höherem pH-Wert etwas höhere Biomassewerte erreicht. Aus derselben Kurve kann man ein schnelleres Wachstum bei höheren pH-Werten ablesen. In einer Berechnung der maximalen spezifischen Wachstumsrate μ_{\max} basierend auf der Biomasse konnte dieser Trend bestätigt werden (Tab. 3.3).

Tab. 3.3: Die maximale spezifische Wachstumsrate μ_{\max} steigt mit dem pH-Wert. Basierend auf der Biomasse wurden die spezifischen Wachstumsraten für die vier verschiedenen pH-Werte berechnet. Kultiviert wurde in optimiertem Bird Medium. Die Regulation mit Lauge setzte bei Erreichen der angegebenen pH-Werte ein.

| pH-Wert der Kultur [-] | μ_{\max} [1/h] |
|------------------------|--------------------|
| unreguliert | 0,071 |
| 4,5 | 0,090 |
| 5,1 | 0,103 |
| 5,7 | 0,110 |

Entsprechend der Polyacrylamidgele scheint die Proteaseaktivität bei pH 5,7 in einer späteren Wachstumsphase einzutreten (Abb. 3.25 E). Um dies zu bestätigen, bedurfte es einer Normierung der Proteaseaktivität auf die Wachstumsphase, da die Kulturen unterschiedlich schnell gewachsen waren und sich somit in unterschiedlichen Phasen befinden konnten. Aus Abb. 3.25 B kann der Zeitpunkt des Absterbens und aus Abb. 3.25 C die bis dahin gebildete CO₂-Menge abgelesen werden. Dieser absolute CO₂-Wert wurde als Maximalwert definiert und entspricht somit 100%. Auch bei unterschiedlich schnellem Wachstum können somit die Proteaseaktivitätsdaten verglichen werden (Abb. 3.25 F). Sekretiert eine Kultur also nur aufgrund ihres langsamen Wachstums keine Proteasen, so kann dies in der entsprechenden Auftragung ermittelt werden.

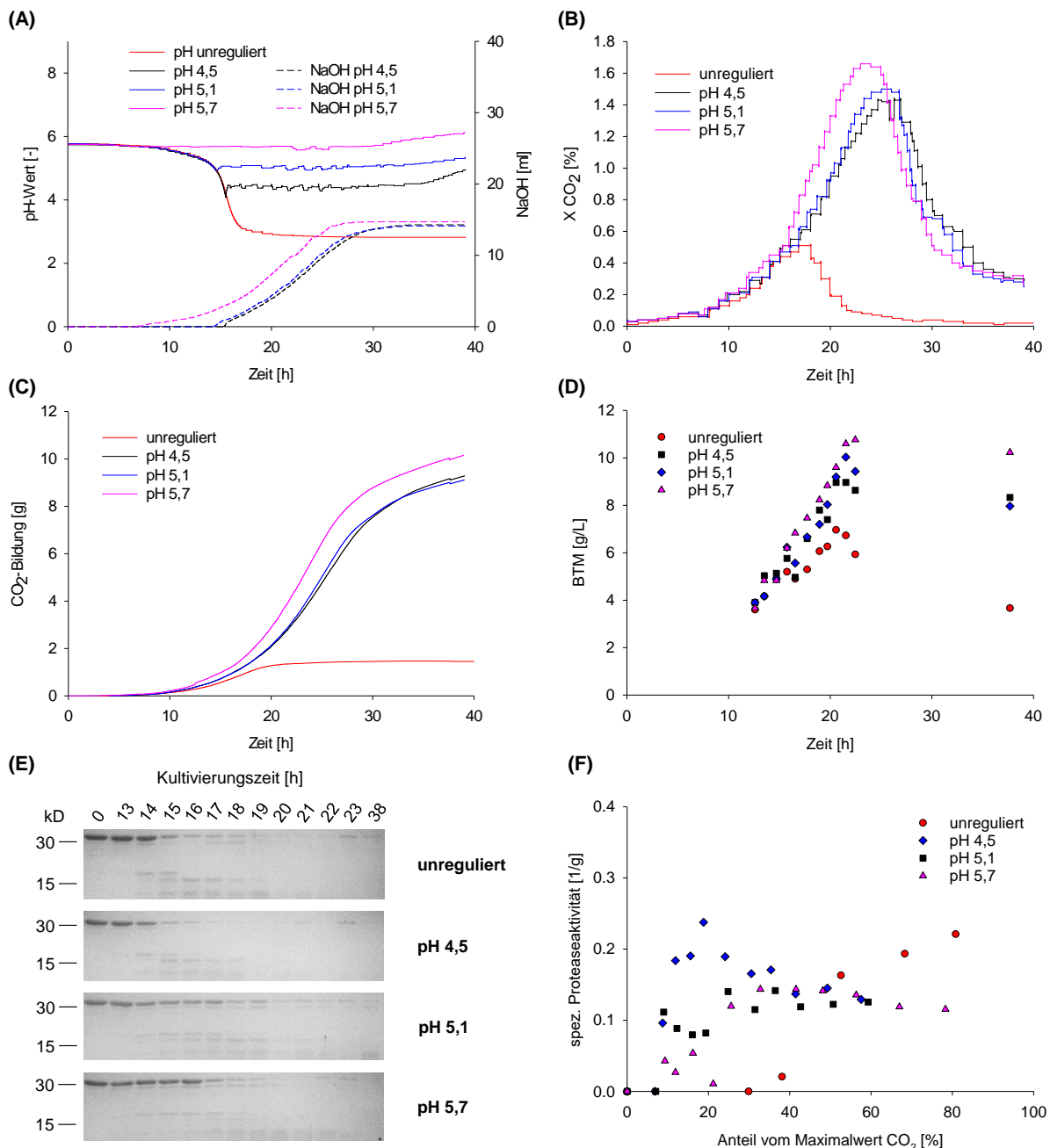


Abb. 3.25: Fehlende Regulation führte zu frühzeitigem Absterben der Kultur in optimiertem Bird Medium und bei höheren pH-Werten setzte die Proteaseaktivität erst in einer späteren Wachstumsphase ein. Der Stamm DHN-201 (*his-3⁺::Pvvd-glat-ht186-13×myc, exo-1, Δvib-1, Δvvd*) wurde in einem parallelen 1 L-Bioreaktorsystem (800 ml Arbeitsvolumen) bei 30 °C in optimiertem Bird Medium mit 20 g/L Maltose kultiviert. Der Gelöstsauerstoffwert wurde bei Erreichen von 20 % durch Regulation der Rührerdrehzahl konstant gehalten. Bei einem Reaktor wurde der pH-Wert nicht reguliert. Bei den übrigen Reaktoren wurde mit einer 2 M NaOH-Lösung auf den entsprechenden Wert geregelt (A). Der Anteil von Kohlenstoffdioxid (B) in der Abluft wurde gemessen und die ausgestoßene Menge zu jedem Zeitpunkt berechnet (C). Zusätzlich wurde die Biotrockenmasse bestimmt (D). Die Reaktoren wurden durchgehend mit einer Lichtquelle bestrahlt, um den *vvd*-Promotor zu aktivieren. Für den Protease-Assay (E) wurden ungefällte Kulturüberstände mit HT186-D11 (produziert in *E. coli*, ca. 1 µg) für 24 h bei 30 °C inkubiert. Als Kontrolle wurde der scFv mit Medium (0) inkubiert. Anschließend wurden die Proben in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Ein Fehlen der Bande bei 30 kD weist auf eine Proteaseaktivität hin. Die Gele wurden grafisch mit der Software ImageJ ausgewertet und die spezifische Proteaseaktivität unter Verwendung der Biomasse berechnet (F). Dafür wurden die Intensitäten der Banden bei ca. 30 kD bestimmt und mit der Kontrolle verglichen. Die Aktivität wurde auf die prozentuale CO₂-Menge bezogen, die bis dahin von der Kultur gebildet wurde. 100 % entspricht dem Zeitpunkt des Absterbens der Kultur und somit dem Maximalwert von CO₂.

Mit der Regulation auf pH 5,7 konnte zwar die Proteaseaktivität nicht unterdrückt werden, jedoch setzt die Aktivität in einer späteren Wachstumsphase ein. Vor diesem Versuch wurde vermutet, dass das Einsetzen der Regulation ein Grund für die Proteasesekretion sein könnte. Sowohl die Kultivierung ohne Regulation als auch mit durchgehender Regulation auf pH 5,7 haben jedoch gezeigt, dass dies ausgeschlossen werden kann, da auch hier deutliche Proteaseaktivität detektiert wurde. Auch das Erreichen eines zu niedrigen pH-Wertes kann im untersuchten Bereich ausgeschlossen werden, da die Kultur, die durchgehend bei pH 5,7 gehalten wurde, nach 17 h ebenfalls Proteasen sekretierte.

Diese Kultivierung hat gezeigt, dass die Verwendung höherer pH-Werte die Sekretion von Proteasen unterbinden bzw. ihre Aktivität verringern könnte. Im Anschluss wurden daher vorläufige Kultivierungen mit pH-Werten zwischen 6 und 9 durchgeführt (Daten siehe Anhang). Unter anderem konnte hierbei gezeigt werden, dass die Wachstumsgeschwindigkeit abhängig vom pH-Wert ist und ein Optimum um pH 6 vorhanden ist. Dadurch ergibt sich das Problem, dass Kulturen, die zum gleichen Zeitpunkt beimpft wurden, sich bei gleichen Probenahmezeitpunkten in unterschiedlichen Wachstumsphasen befanden und daher der Vergleich der Proteaseaktivität nur durch die Normierung auf die Wachstumsphase möglich war.

3.4.4.2 Kultivierung bei pH-Wert zwischen pH 6,5 und 7,5

Mit diesem Versuch sollten der optimale pH-Wert eingegrenzt werden, bei welchem Kulturen die geringste Proteaseaktivität aufweisen. Aufgrund vorläufiger Daten wurde daher ein Bereich von pH-Wert 6,5 und 7,5 untersucht. Dieses Ergebnis wurde durch die Normierung unterschiedlich schnell gewachsener Kulturen auf ihre Wachstumsphase erhalten. Die dadurch gewonnene Einschätzung der Proteaseaktivität muss jedoch zusätzlich mit experimentellen Daten bestätigt werden, welche durch Probenahmen in vergleichbaren Wachstumsphasen erhalten werden. Daher wurde in diesem Abschnitt eine gestaffelte Kultivierung durchgeführt. Dazu wurden die Kulturen zu unterschiedlichen Zeitpunkten inokuliert basierend aus der Erfahrung vorangegangener Kultivierungen. Es wurde abgeschätzt, welche XCO₂-Werte maximal erreicht werden könnten und es wurde versucht, die Proben ungefähr zu vergleichbaren relativen Zeitpunkten zu entnehmen. Dies führte dementsprechend zu unterschiedlichen absoluten Zeitpunkten bei der Probenahme. Gleichzeitig wurde versucht, den optimalen pH-Wert-Bereich einzugrenzen. Die Auswertung erfolgte anschließend relativ zur Kultivierungszeit (Abb. 3.26).

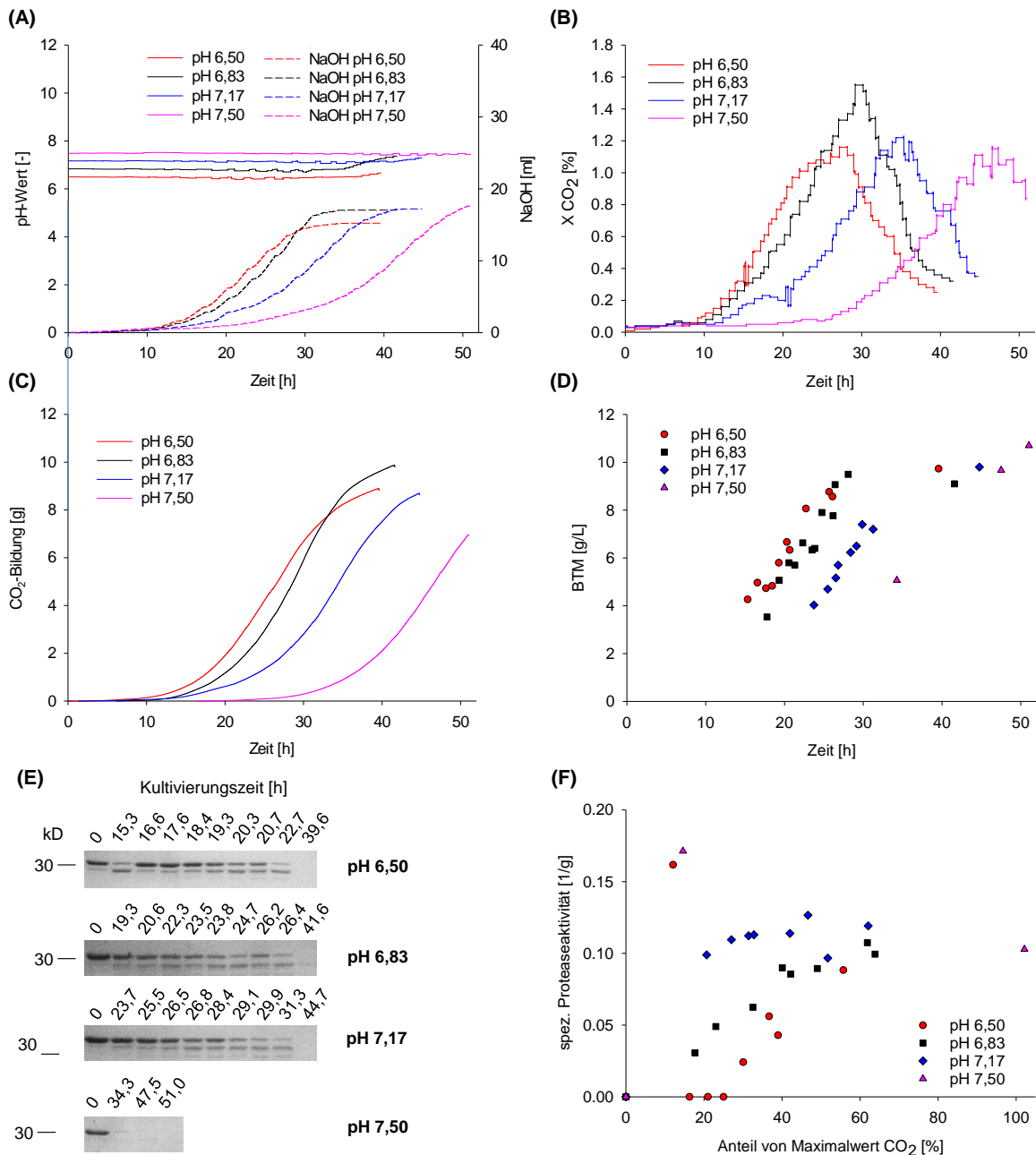


Abb. 3.26: Je höher der pH-Wert oberhalb von pH 6,5 war, desto langsamer wuchsen die Kulturen. Die geringste Proteaseaktivität wurde erneut bei pH 6,5 erreicht. Der Stamm DHN-201 (*his-3⁺::Pvvd-glat-ht186-13×myc, exo-1, Δvib-1, Δvvd*) wurde in einem parallelen 1 L-Bioreaktorsystem (800 ml Arbeitsvolumen) bei 30 °C mit optimiertem Bird Medium mit 20 g/L Maltose kultiviert. Der Gelöstsauerstoffwert wurde bei Erreichen von 20 % durch Erhöhung der Rührerdrehzahl konstant gehalten. Der pH-Wert wurde mit einer 2 M NaOH-Lösung auf den entsprechenden Wert von Beginn an geregelt (A). Der Anteil von Kohlenstoffdioxid (B) in der Abluft wurde gemessen und die ausgestoßene Menge zu jedem Zeitpunkt berechnet (C). Zusätzlich wurde die Biotrockenmasse bestimmt (D). Die Reaktoren wurden durchgehend mit einer Lichtquelle bestrahlt, um den *vvd*-Promotor zu aktivieren. Für den Protease-Assay (E) wurden ungefällte Kulturüberstände mit HT186-D11 (produziert in *E. coli*, ca. 1 µg) für 24 h bei 30 °C inkubiert. Als Kontrolle wurde der scFv mit Medium (0) inkubiert. Anschließend wurden die Proben in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Ein Fehlen der Bande bei 30 kD weist auf eine Proteaseaktivität hin. Die Gele wurden grafisch mit der Software ImageJ ausgewertet und die spezifische Proteaseaktivität unter Verwendung der Biomasse berechnet (F). Dafür wurden die Intensitäten der Banden bei ca. 30 kD bestimmt und mit der Kontrolle verglichen. Die Aktivität wurde auf die prozentuale CO₂-Menge bezogen, die bis dahin von der Kultur gebildet wurde. 100 % entspricht dem Zeitpunkt des Absterbens der Kultur und somit dem Maximalwert von CO₂.

Vor der Durchführung wurde versucht abzuschätzen, wie schnell die Kulturen bei den unterschiedlichen pH-Werten wachsen werden. Diese Abschätzung hat mit Ausnahme von pH 7,50 gut funktioniert. Diese Kultur wuchs wesentlich langsamer als erwartet, weshalb nur drei Proben dieser Kultur für weitere Untersuchungen entnommen werden konnten. Wie schon im vorangegangenen Versuch führten höhere pH-Werte zu langsamerem Wachstum. Dies ist besonders gut an den Abgasdaten abzulesen (Abb. 3.26 C und D). Der Unterschied zwischen den Kulturen bei pH 6,50 und 6,83 war hierbei geringer als bei den höheren pH-Werten. Trotz des langsameren Wachstums wurde bei allen Kulturen ungefähr die gleiche Biomasse gebildet. Die zugegebene Menge an Lauge bestätigt dies (Abb. 3.26 A), da sie bei allen Kulturen vergleichbar war. Die Berechnung der maximalen spezifischen Wachstumsrate (Tab. 3.4) kann zwar ungefähr die Tendenz der fallenden maximalen spezifischen Wachstumsrate mit steigendem pH-Wert bestätigen, sie zeigt allerdings auch, dass die Berechnung dieser Kennzahl mittels Biomassedaten ungenau ist. Aufgrund von Schwankungen in der Biomasse könnten die Kennzahlen daher verfälscht sein. An der unterschiedlich hohen maximalen spezifischen Wachstumsrate kann in Betracht der Abgasdaten aber kein Zweifel bestehen (Abb. 3.26 B)

Tab. 3.4: Die berechneten Werte der maximalen spezifischen Wachstumsrate der Kulturen bei verschiedenen pH-Werten zeigen keine eindeutige Tendenz auf. Kultiviert wurde in optimierten Bird Medium.

| pH-Wert der Kultur [-] | μ_{\max} [1/h] |
|------------------------|--------------------|
| 6,50 | 0,085 |
| 6,83 | 0,071 |
| 7,17 | 0,083 |
| 7,50 | 0,049 |

Die Überstände wurden auf Proteaseaktivität untersucht und die spezifische Proteaseaktivität ausgewertet. Für eine optimale Vergleichbarkeit wurde eine Auswahl der Proben basierend auf der Wachstumsphase, in der sie entnommen wurden, getroffen. Dazu wurden die Abgasdaten verwendet, um zu berechnen, welcher Anteil des Maximalwertes der gebildeten Absolutmenge von CO₂ erreicht wurde. Vergleichbare Proben wurden danach auf den gleichen Positionen auf den Polyacrylamidgelen aufgetragen (Abb. 3.26 A). Die tatsächlichen Zeitpunkte der Probenahme sind daher unterschiedlich. Auch bei dieser Kultivierung wurde bei allen verwendeten pH-Werten Proteaseaktivität nachgewiesen. Wie schon im vorangegangenen Versuch setzt bei pH 6,50 die Proteaseaktivität am spätesten ein. Dies konnte allerdings erst durch die spezielle Auftragung gegen die Abgasdaten eindeutig gezeigt werden (Abb. 3.26 F). Bei pH 6,50 zeigte die Probe nach 15,3 h eine wesentlich höhere Aktivität auf als die darauffolgenden Proben. Es wird angenommen, dass es sich hierbei um einen Ausreißer

handelt. Die Proteaseaktivität war besonders bei pH 7,50 sehr hoch. Bereits bei der ersten Probe war die Proteaseaktivität so hoch, dass der scFv im Assay nach 24 h komplett abgebaut war. Dies wurde normalerweise erst in der Absterbephase von Kulturen beobachtet. Basierend auf allen bislang durchgeführten Kultivierungen, wurde das pH-Optimum für die geringste Proteaseaktivität bei pH 6,50 ermittelt. Dieses Optimum stimmt jedoch nicht mit dem Optimum der höchsten Wachstumsgeschwindigkeit überein (ca. pH 6,00).

Die Optimierung des Prozesses in Bezug auf die Proteaseaktivität führte zur Anpassung des Produktionsmediums in Bezug auf die Art und den Gehalt der Stickstoffquelle (32,5 mM Ammoniumsulfat), den pH-Wert von 6,50 und die Verwendung von 20 g/L Maltose als C-Quelle. Diese optimierten Bedingungen stellen ausreichende Mengen an Stickstoff bereit, führen zu spät einsetzender Proteaseaktivität und hoher Sekretion von Proteinen. Im nächsten Schritt können nun Produktionsstämme mit verschiedenen Promotoren unter diesen Bedingungen kultiviert werden und die Produktion des heterologen Fusionsproteins überprüft werden.

3.4.5 Einfluss des Promotors im optimierten Prozess

In den vorangegangenen Abschnitten wurde die Medienzusammensetzung optimiert sowie eine neue Prozessführung eingeführt, bei welcher die Proteaseaktivität unter den gegebenen Bedingungen am geringsten ist. Unter diesen Bedingungen sollte untersucht werden, mit welchem Promotor die größte Produktmenge erreicht werden kann. Dazu wurden die Promotoren *Pvvd* und *Pccg-1* verglichen. Bislang war *Pccg-1* der stärkste Promotor in den Experimenten, allerdings wurde vermutet, dass er durch die aus Maltose freigesetzte Glucose zumindest zum Teil reprimiert wurde (McNally & Free, 1988). Daher wurde versucht, eine nicht-reprimierbare Variante dieses Promotors zu generieren. *Pccg-1* enthält zwei cis-regulatorische Elemente, welche für die Repression verantwortlich sind, wenn dem Pilz Glucose zur Verfügung steht. Bei den Elementen handelt es sich um NRS (*Neurospora Repressor Site*) und CRE (*Cyclic AMP Response Element*) mit einer Länge von jeweils 10 bp (Wang *et al.*, 1994). Diese zwei DNA-Abschnitte wurden deletiert und somit ein Promotor erzeugt, welcher nun nicht mehr durch Glucose reprimierbar sein sollte (*Pccg1nr*, nicht-reprimierbar). Dadurch konnten insgesamt drei verschiedene Promotoren verglichen werden (*Pvvd*, *Pccg-1*, *Pccg1nr*). Da mit dem nativen Glucoamylasepromotor bislang keine Produktion des Fusionsproteins erreicht werden konnte, wurde auf dessen Untersuchung im weiteren Verlauf verzichtet. Die Kultivierung dieser Stämme wurde in optimiertem Bird

Medium bei pH 6,5 durchgeführt. Die Produktion wurde mittels Western Blot überprüft (Abb. 3.27).

Alle drei Kulturen zeigten identische Wachstumsverläufe, die Verwendung der unterschiedlichen Promotoren hat das Wachstum nicht beeinflusst. Sowohl die Zugabe der Lauge (Abb. 3.27 A) als auch die CO₂-Abgasdaten (B, C) hatten den gleichen Verlauf und erreichten gleiche Endwerte. Der Biomasseverlauf zeigte eindeutig an, dass in der Absterbephase nach ca. 27 h die Biomasse abgebaut wurde, es also zu Autolyse gekommen sein muss. Durch die Prozessoptimierung konnten bei allen Promotoren größere Mengen an Fusionsprotein (E) nachgewiesen werden. Dabei ist der Einfluss der Proteasen gut zu erkennen. Nach 18 bis 19 h wurde das Fusionsprotein bei >100 kD nachgewiesen. Mit der Zeit bildeten sich zusätzlich Abbauprodukte, unter anderem bei ca. 40 kD und 55 kD. Noch bevor die Absterbephase begann, verringerte sich die nachgewiesene Menge an vollständigem Fusionsprotein, teilweise gelang nach 28 h bereits keine Detektion mehr. Die Menge an Abbauprodukt bei 40 kD hingegen vergrößerte sich mit der Zeit. Bei allen drei Stämmen wurde Proteaseaktivität detektiert, allerdings war die Aktivität bei der Verwendung von *Pccg1nr* am geringsten. Im Assay konnte zu Beginn der Absterbephase sogar noch vollständiger scFv erkannt werden, was vor der Prozessoptimierung nie gelang.

Der Überstand enthielt große Mengen an Protein, darunter hauptsächlich die Glucoamylase (bei ca. 70 kD). Eine eindeutige Bande bei 105 kD (potentielles Fusionsprotein) war jedoch auf den mit Coomassie gefärbten Gelen nicht vorhanden. Nach 42 h Kultivierung wird deutlich, dass durch den lytischen Prozess offensichtlich auch die Glucoamylase abgebaut wurde, da die Bande bei 70 kD schwächer geworden ist und eine neue Bande bei 50 kD hinzugekommen ist. Der Vergleich der Promotoren zeigte große Unterschiede in der Proteinproduktion auf. Da alle Belichtungszeiten im Western Blot gleich lang waren, ist ein qualitativer Vergleich möglich. *Pvvd* hat eindeutig zur geringsten Produktion des Fusionsproteins geführt, bei *Pccg-1* und *Pccg1nr* wurden größere Mengen an heterologem Protein produziert. Da sich die Proteaseaktivität dieser beiden Kulturen leicht unterschied, ist ein eindeutiger Vergleich erschwert. Jedoch scheint die Einführung der Deletionen in *Pccg1nr* tatsächlich zu einer Erhöhung der Ausbeute zu führen, da die Banden des vollständigen Fusionsproteins wesentlich stärker erscheinen. Obwohl *Pccg-1* durch Glucose reprimiert sein sollte, wurden verhältnismäßig hohe Produktmengen detektiert, die Repression kann zumindest im verwendeten System nicht bestätigt werden.

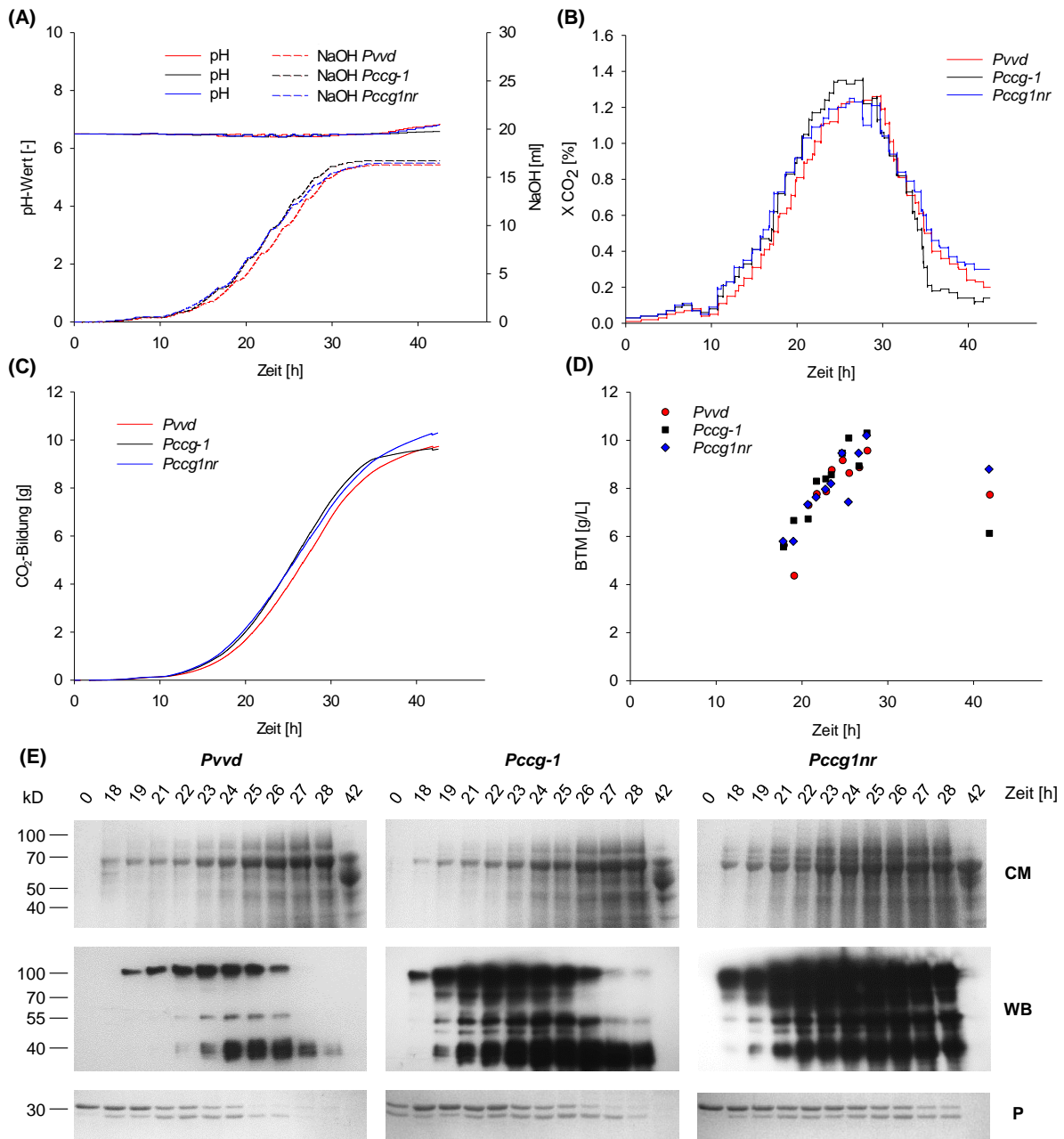


Abb. 3.27: Die Prozessoptimierung hat bei allen drei Promotoren zu einer starken Verbesserung der Produktion des Fusionsproteins geführt. Drei Stämme mit unterschiedlichen Promotoren wurden in einem parallelen 1 L-Bioreaktorsystem (800 ml Arbeitsvolumen) bei 30 °C in optimiertem Bird Medium mit 20 g/L Maltose bei einem durchgehenden pH-Wert von 6,5 kultiviert: **Pvvd** (DHN-201: *his-3⁺::Pvvd-glat-ht186-13×myc, exo-1, Δvib-1, Δvvd*), **Pccg-1** (DHN-172: *his-3⁺::Pccg-1-glat-ht186-13×myc, exo-1, Δvib-1, Δvvd*) und **Pccg1nr** (DHN-250: *his-3⁺::Pccg1nr-glat-ht186-13×myc, exo-1, Δvib-1, Δvvd*). Der Gelöstsauerstoffwert wurde bei Erreichen von 20 % durch Erhöhung der Rührerdrehzahl konstant gehalten. Der pH-Wert wurde mit einer 2 M NaOH-Lösung auf den entsprechenden Wert von Beginn an geregelt (A). Der Anteil von Kohlenstoffdioxid (B) in der Abluft wurde gemessen und die gebildete CO_2 -Menge zu jedem Zeitpunkt berechnet (C). Zusätzlich wurde die Biotrockenmasse bestimmt (D). Die Reaktoren wurden durchgehend mit einer Lichtquelle bestrahlt, um den *vvd*-Promotor zu aktivieren. (E) Proteine im Überstand wurden gefällt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie-Färbung (CM) analysiert. In einem Western Blot wurde der *myc-tag* des Fusionsproteins detektiert (WB). Die Entwicklung des Western Blots erfolgte mittels ECL-Methode (Belichtung des Filmes für 1 sek). Für den Protease-Assay (P) wurden ungefällte Kulturüberstände mit HT186-D11 (produziert in *E. coli*, ca. 1 µg) für 24 h bei 30 °C inkubiert. Als Kontrolle wurde der scFv mit Medium (0) inkubiert. Anschließend wurden die Proben in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Ein Fehlen der Bande bei 30 kD weist auf eine Proteaseaktivität hin.

3.4.6 Fazit der Optimierung des Prozesses

Die Prozessoptimierung (optimiertes Bird Medium mit 32,5 mM Ammoniumsulfat und pH 6,5) hat zu einer signifikanten Verbesserung der Proteinproduktion geführt. Dies wird besonders dann deutlich, wenn die Produktion im Stamm DHN-201 (*Pvvd*) vor (Abb. 3.21) und nach (Abb. 3.27) der Optimierung verglichen wird. Obwohl in Abb. 3.21 die Belichtungszeit 2 min betrug, konnte nur eine sehr schwache Bande zu einem einzigen Zeitpunkt generiert werden. In Abb. 3.27 betrug die Belichtungszeit lediglich 1 sek (also um Faktor 120 weniger), dennoch sind die Signalstärken um ein Vielfaches höher. Eine weitere Erhöhung der Produktausbeute wurde durch den Einsatz des nicht-reprimierbaren *PccgInr*-Promotors erreicht. Obwohl der Unterschied zwischen den Promotoren *Pccg-1* und *PccgInr* nur minimal ist, wurde in zukünftigen Stämmen zur Vereinfachung nur noch *PccgInr* verwendet.

Obwohl die heterologe Proteinproduktion mittlerweile erfolgreich etabliert wurde, bestand weiterhin die Problematik des Abbaus des Produktes durch Proteasen, die ebenfalls in den Kulturüberstand gelangen. Selbst nach Prozessoptimierung sekretierten alle Produktionsstämme Proteasen, obwohl sie die *vib-1*-Deletion trugen. Stämme mit dieser Deletion sind daher für eine stabile Produktion ungeeignet. Daher musste ein weiterer Strategiewechsel bezüglich der Proteasedefizienz der Produktionsstämme durchgeführt werden. Gleichzeitig wurde der 13×*myc-tag* durch einen *his₁₀-tag* ausgewechselt. Zum einen wird die Sensitivität des Western Blots verringert (und somit klarere Signale erzeugt), zum anderen wird eine Aufreinigung des Fusionsproteins durch Affinitätschromatographie ermöglicht.

In Abschnitt 1.5.1 wurde bereits erwähnt, dass Proteasedefizienz auch durch die gezielte Deletion von einzelnen Proteasegenen erreicht werden kann. Diese Gene sollten im folgenden Abschnitt identifiziert werden.

3.5 Proteasedefizienz durch Deletionen von einzelnen Proteasegenen

3.5.1 Auswahl an zu überprüfenden Proteasegenen

Im vorangegangenen Abschnitt hatte sich gezeigt, dass die Deletion von *vib-1* in Produktionsstämmen nicht die erhoffte, Produkt-relevante Proteasedefizienz mit sich bringt. Gleichzeitig sekretieren Stämme mit $\Delta vib-1$ geringere Mengen an Protein als der Wildtyp, wodurch in Produktionsstämmen die Ausbeute durch Einbringen dieser Deletion verringert wird. Eine weitere Möglichkeit, Proteasedefizienz zu erreichen, ist das Ausschalten aller Proteasegene, welche für den Abbau des heterologen Proteins verantwortlich sind. Hier kommt der Vorteil zum Tragen, dass für *N. crassa* eine Gen-Knock-Out-Bibliothek generiert wurde (Colot *et al.*, 2006). Es können daher auf einfache Weise Deletionsmutanten getestet werden, bei welchen jeweils ein Proteasegen ausgeschaltet ist. Werden mehrere Gene bzw. Proteasen identifiziert, so können diese durch Kreuzung in einem Stamm kombiniert werden.

Für die Auswahl der Proteasegene wurden zwei Strategien verfolgt. In der ersten Strategie wurde eine *N. crassa* Gendatenbank (Broad Institute of Harvard and MIT, Cambridge, MA, USA) auf das Stichwort „Protease“ durchsucht, wodurch sämtliche intra- und extrazellulären Proteasen sowie Protease-relevante Gene erfasst werden (81 Gene). Anschließend wurde diese Liste gekürzt, indem Proteasegene, welche eindeutig nicht sekretierte Proteasen kodieren, entfernt wurden. Solche Proteasen befinden sich zum Beispiel in der mitochondriellen Membran oder in den Vakuolen. Des Weiteren wurden ebenfalls Gene aussortiert, welche eindeutig keine Proteasen kodieren, zum Beispiel Gene von Ribonucleasen. Dadurch wurde die Liste auf 23 Proteasegene reduziert.

Die zweite Strategie befasste sich mit Proteasen, welche im Sekretom von *Aspergillus niger* nachgewiesen wurden (Braaksma *et al.*, 2010). Von den 20 aufgeführten Genen konnten von 14 Genen homologe Varianten im *N. crassa*-Genom identifiziert werden, wobei zum Teil mehrere *A. niger*-Gene homolog zu nur einem Gen bei *N. crassa* waren. Nach Vereinigung der Gene wurden 33 Gene erhalten, da einige Gene in beiden Strategien vorkamen. Nur für 26 Gene waren in der Knock-Out-Bibliothek Deletionsmutanten vorhanden, in Tab. 3.5 sind alle 33 ausgewählten Proteasegene aufgelistet. Alle vorhandenen Stämme wurden der Knock-Out-Bibliothek entnommen. Keiner der Deletionsstämmen wies einen auffälligen Phänotyp auf.

Tab. 3.5: Auswahl an Proteasegenen für die Identifizierung von Proteasen, welche für den Abbau von heterologen Proteinen verantwortlich sein könnten. Gene wurden über eine Datenbanksuche des Broad Institutes oder über das *A. niger*-Sekretom (Braaksma *et al.*) identifiziert. Für letzteres wurde der entsprechende *A. niger*-Locus mit angegeben. Die Deletionsstämme sind mit ihrer FGSC-Nummer angegeben (sortiert nach *mating type*).

| <i>N. crassa</i> -Locus über Broad Institute | <i>N. crassa</i> -Locus über Braaksma <i>et al.</i> | <i>A. niger</i> Locus | <i>N. crassa</i> Genname | Trivialname | FGSC Knock-out Mutante mat a/A |
|--|---|--------------------------|-----------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| | NCU00338 | | apr-1 | aspartic proteinase | 17476/17477 |
| NCU00673 | | | spr-4 | serine protease p2 | k. A, Heterokaryon |
| NCU03168 | | | apr-5 | aspartic-type endopeptidase | 14075/- |
| NCU03219 | | | spr-3 | serine protease-3/Kex2 | 20115/- (Het.) |
| NCU04269 | | | apr-6 | aspartyl proteinase | 18890/18891 |
| NCU06834 | | | - | ADAM protease ADM-B | -/14847 |
| NCU07063 | | | apr-8 | aspartyl protease-8 | 14718/14719 |
| NCU09484 | | | apr-12 | hypothetical protein | 14720/14721 |
| | NCU00831 | An12g05960 | - | extracell. serine carboxypeptidase | 16399/- |
| | NCU00994 | An14g04710 | apr-2 | endothiapepsin | 16538/- |
| | NCU04430 | An03g01660 | - | leupeptin-inactivating enzyme 1 | 16457/- |
| | NCU04903 | An01g01750 | - | tripeptidyl peptidase I | -/13518 |
| | NCU05980 | An03g05200 | - | carboxypeptidase S1 | 13725/13726 |
| | NCU06720 | An02g04690 | - | carboxypeptidase cpdS | 12322/12323 |
| | NCU09350 | An12g03300 | - | aspartic-type endopeptidase | -/16097 |
| | NCU09992 | An08g04490 | - | serine peptidase | -/18064 |
| NCU00263 | | | - | serin endopeptidase | 11868/11869 |
| NCU01151 | | | mpr-1 | calpain-B | 11847/- |
| NCU03355 | | | mpr-2 | metalloprotease-2/calpain-5 | 12071/- |
| NCU07159 | | | spr-7 | proteinase T | -/12115 |
| NCU08739 | | | apr-10 | endothiapepsin | 11950/11951 |
| NCU10907 | NCU10907 | An04g01440 | apr-13 | PEPad | 14728/- |
| NCU04953 | NCU04953 | An15g06280 | apr-7 | penicillopepsin | 13333/13334 |
| NCU02059 | NCU02059 | An01g00370 | apr-3 | endothiapepsin | 13284/- |
| NCU06055 | | | spr-5 | extracellular alkaline protease | 13553/13554 |
| NCU07533 | | | apr-9 | secreted aspartic proteinase | 14476/14477 |
| NCU02956 | NCU02956 | An18g01320 | apr-4 | aspartic proteinase | -/- |
| | NCU08418 | An14g02470 | - | tripeptidyl-peptidase | -/- |
| NCU02433 | | | cpr-1 | cysteine protease-1 | -/- |
| NCU04578 | | | spr-2 | ATP-dependent Clp protease | -/- |
| NCU05160 | | | - | ATP-dependent Zn protease | -/- |
| NCU09155 | | | apr-11 | hypothetical protein | -/- |
| NCU11314 | | | - | CaaX prenyl proteinase Rce1 | -/- |

3.5.2 Überprüfung von Proteasedelektionsmutanten auf verringerte Proteaseaktivität

Für die Analyse der Proteaseaktivität wurde der etablierte Protease-Assay verwendet, welcher auf dem Abbau des scFv beruht und dessen Auswertung über eine SDS-PAGE verläuft. Für eine breitere Untersuchung der Proteaseaktivität wurde der Assay erweitert, indem neben HT186-D11 auch D1.3 und die zwei weiteren scFv SH511-IIB1 und TOB5-D4 verwendet wurden. Dadurch sollte ein breiteres Analysespektrum für die Proteaseaktivität geschaffen werden. Für den Test wurden die Deletionsmutanten für ca. 40 h submers in Vogel's Minimalmedium mit Maltose (10 g/L) kultiviert (100 ml Schüttelkolben ohne Schikane) und der Überstand für den Protease-Assay eingesetzt (Abb. 3.28). Alle Kultivierungen wurden mehrmals durchgeführt. Aufgeführt ist lediglich eine Auswahl an Deletionsmutanten, welche eine reduzierte Proteaseaktivität aufwiesen sowie die Kontrollstämme (Wildtyp und $\Delta vib-1$).

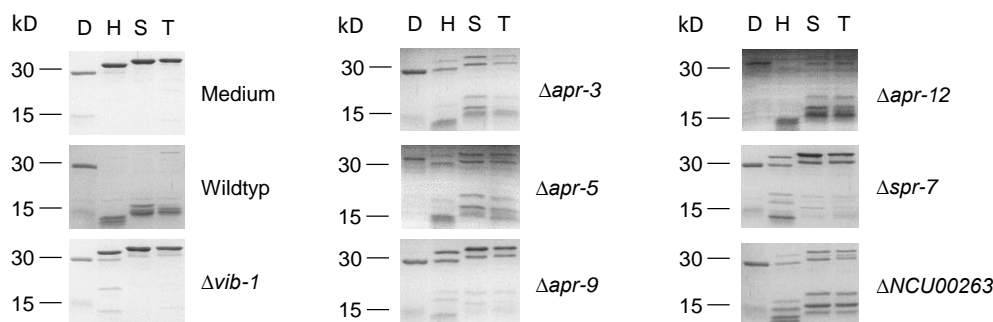


Abb. 3.28: Auswahl von Protease-Deletionsstämmen, welche einen unterschiedlichen Grad an Proteaseaktivität aufwiesen. Flüssigkulturen wurden für 40 h bei 30 °C in Minimalmedium mit Maltose inkubiert. Für den Protease-Assay wurden ungefällte Kulturüberstände mit scFv (produziert in *E. coli*, ca. 1 µg) für 24 h bei 30 °C inkubiert: (D) D1.3, (H) HT186-D11, (S) SH511-IIB1, (T) TOB5-D4. Als Kontrolle wurden die scFv mit Medium, sowie mit Kulturüberstand des Wildtyps und des proteasedefizienten Stammes $\Delta vib-1$ inkubiert. Anschließend wurden die Proben in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Ein Fehlen der Banden bei ca. 30 kD weist auf eine Proteaseaktivität hin, welche spezifisch für den eingesetzten scFv ist.

Ungefähr ein Drittel aller getesteten Stämme wies eine verringerte Proteaseaktivität auf. Der scFv D1.3 wurde bei keiner einzigen Probe abgebaut, die übrigen drei scFv wurden von *N. crassa*-Proteasen abgebaut, HT186-D11 zeigte jedoch die höchste Sensitivität gegenüber den Proteasen auf. Am Abbaumuster ist gut zu erkennen, dass sich zunächst ein Abbauprodukt bildete, dessen Molekulargewicht um ca. 2 kD reduziert war, anschließend bildeten sich Produkte mit ca. 15 kD. Dadurch können auch unterschiedlich hohe Proteaseaktivitäten detektiert werden. Im verwendeten Assay zeigten sich große Unterschiede in der Verringerung der Aktivität. So war die Verringerung bei $\Delta spr-7$ am höchsten, viele Deletionsstämmen zeigten jedoch nur eine geringe Reduzierung der Aktivität (z.B. $\Delta apr-3$). Keiner der getesteten Stämme erreichte die verringerte Proteaseaktivität des Kontrollstammes $\Delta vib-1$. Alle Stämme wurden bis zu dreimal kultiviert und die Proteaseaktivität bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die

Aktivität innerhalb der Stämme auch schwanken kann. Bei $\Delta apr-9$ wurde in zwei Fällen eine hohe Verringerung detektiert, in einem Fall wurde jedoch wildtypische Proteaseaktivität detektiert. Daher wurde ein Bewertungssystem eingeführt, bei welchem das Abbaumuster des zu untersuchenden Stammes mit dem des Wildtyps verglichen wurde. Waren diese identisch, so wurden 0 Punkte vergeben, vollständige Abwesenheit der Proteaseaktivität wurde mit 5 Punkten bewertet. Dadurch konnten alle Protease-Deletionsmutanten miteinander verglichen werden (Tab. 3.6).

Tab. 3.6: Ein Drittel der getesteten Protease-Deletionsmutanten zeigte eine verringerte Proteaseaktivität auf. Der Protease-Assay wurde ausgewertet, indem der Abbau beim zu untersuchenden Stamm mit dem Abbau beim Wildtyp verglichen wurde. Wildtypischer Abbau wurde mit 0 Punkten bewertet, vollständige Abwesenheit der Aktivität mit 5 Punkten. Angegeben ist der Mittelwert.

| <i>N. crassa</i> -Locus über Broad Institute | | über Braaksma <i>et al.</i> | <i>N. crassa</i> Genname | kodiertes Protein | Bewertung |
|--|----------|--------------------------------|-----------------------------|--|-----------|
| NCU07159 | | | spr-7 | proteinase T | 4.0 |
| NCU07533 | | | apr-9 | secreted aspartic proteinase | 2.7 |
| NCU00263 | | | - | serin endopeptidase | 2.0 |
| NCU03168 | | | apr-5 | aspartic-type endopeptidase | 1.0 |
| NCU09484 | | | apr-12 | hypothetical protein | 1.0 |
| NCU02059 | NCU02059 | | apr-3 | endothiapepsin | 1.0 |
| NCU10907 | NCU10907 | | apr-13 | PEPad | 0.7 |
| | NCU00994 | | apr-2 | endothiapepsin | 0.5 |
| | NCU00338 | | apr-1 | aspartic proteinase | 0 |
| NCU00673 | | | spr-4 | serine protease p2 | 0 |
| NCU03219 | | | spr-3 | serine protease-3/Kex2 | 0 |
| NCU04269 | | | apr-6 | aspartyl proteinase | 0 |
| NCU06834 | | | - | ADAM protease ADM-B | 0 |
| NCU07063 | | | apr-8 | aspartyl protease-8/hypothetical protein | 0 |
| | NCU00831 | | - | extracellular serine carboxypeptidase | 0 |
| | NCU04430 | | - | leupeptin-inactivating enzyme 1 | 0 |
| | NCU04903 | | - | tripeptidyl peptidase I | 0 |
| | NCU05980 | | - | carboxypeptidase S1 | 0 |
| | NCU06720 | | - | carboxypeptidase cpdS | 0 |
| | NCU09350 | | - | aspartic-type endopeptidase | 0 |
| | NCU09992 | | - | serine peptidase | 0 |
| NCU01151 | | | mpr-1 | calpain-B | 0 |
| NCU03355 | | | mpr-2 | metalloprotease-2/calpain-5 | 0 |
| NCU08739 | | | apr-10 | endothiapepsin | 0 |
| NCU04953 | NCU04953 | | apr-7 | penicillopepsin | 0 |
| NCU06055 | | | spr-5 | extracellular alkaline protease | 0 |

Von den 26 analysierten Mutanten haben 18 eine wildtypische Proteaseaktivität aufgewiesen. Bei 8 Stämmen konnten verschiedene Grade der Verringerung festgestellt werden. Die Proteaseaktivität von Stämmen, welche eine Bewertung von $> 1,0$ erhielten, wurde in einer parallelen Mehrfachkultivierung nochmals untersucht (Daten nicht gezeigt). Die Stämme mit den Deletionen $\Delta apr-5$ und $\Delta apr-12$ zeigten dabei eine wildtypische Proteaseaktivität. Für eine Erzeugung eines proteasedefizienten Produktionsstammes basierend auf Deletionen von einzelnen Proteasegenen wurden daher die Gene *spr-7*, *apr-9*, *apr-3* und *NCU00263* (ab hier abgekürzt mit $\Delta 263$) ausgewählt. Im nächsten Schritt wurden die Doppelmutanten $\Delta spr-7$ und $\Delta apr-9$ sowie $\Delta apr-3$ und $\Delta 263$ mittels Kreuzung erzeugt und überprüft, ob die Verringerung der Proteaseaktivität additiv ist (Abb. 3.29).

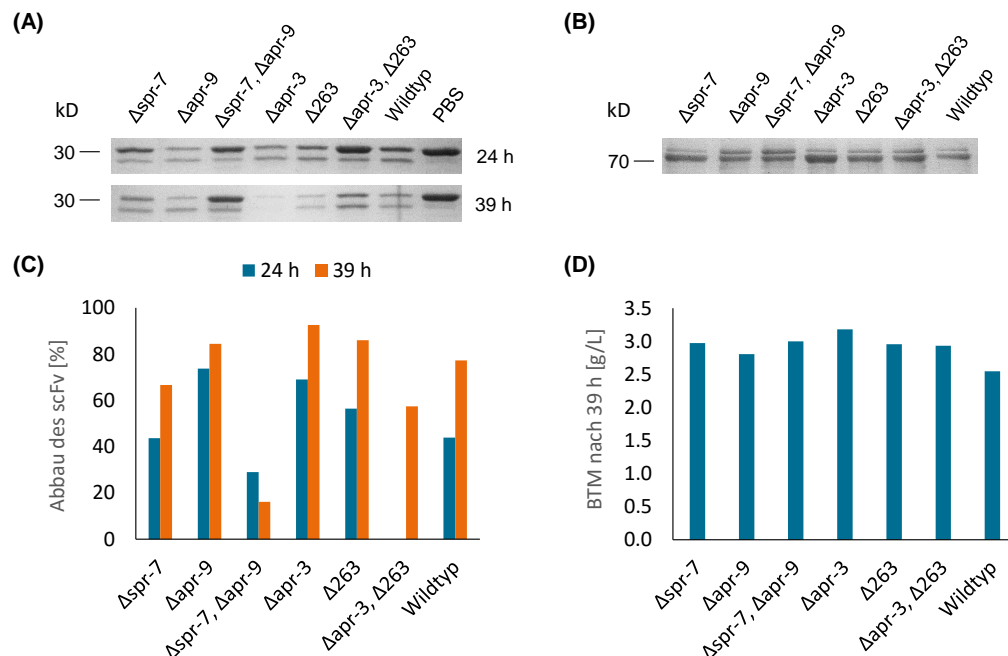


Abb. 3.29: Protease-Doppelmutanten zeigten eine geringere Proteaseaktivität als die entsprechenden Einzel-Deletionsmutanten. Flüssigkulturen wurden für 24 h und 39 h bei 30 °C in Minimalmedium mit Maltose inkubiert. Für den Protease-Assay (A) wurden ungefällte Kulturüberstände mit HT186-D11 (produziert in *E. coli*, ca. 1 µg) für 10 h bei 30 °C inkubiert. Als Kontrolle wurde der scFv mit PBS inkubiert. Anschließend wurden die Proben in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Ein Fehlen der Bande bei 30 kD weist auf eine Proteaseaktivität hin. Proteine im Überstand (B) wurden gefällt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie-Färbung analysiert. Die Gele des Protease-Assays wurden grafisch mit der Software ImageJ ausgewertet und der Grad des Abbaus berechnet (C). Dafür wurden die Intensitäten der Banden bei ca. 30 kD bestimmt und mit der Kontrolle verglichen. Die Biotrockenmasse der Kulturen nach 39 h wurde bestimmt (D).

Bei beiden erzeugten Doppelmutanten war die Verringerung der Proteaseaktivität additiv, da in beiden Fällen die Proteaseaktivität geringer war als die der entsprechenden Einzelmutanten (Abb. 3.29 A, C). Dies konnte in Kulturüberstand nach 24 h und 39 h submerser Kultivierung gezeigt werden. Sowohl die Einzel- als auch die Doppelmutanten sekretierten die gleiche Menge an Glucoamylase wie der Wildtyp, die Biomasse unterschied sich ebenfalls nicht von

der vom Wildtyp (B). Alle Stämme haben ungefähr die gleiche Biomasse wie der Wildtyp (D) gebildet, die Deletionen beeinflussten das Wachstum folglich nicht.

Dieser Versuch hat gezeigt, dass die Kombination mehrerer Deletionen von Proteasegenen in Bezug auf die Verringerung der Proteaseaktivität sinnvoll ist. Daher sollte ein neuartiger Produktionsstamm erzeugt werden, welcher alle vier Deletionen aufweisen sollte. Das Ziel war hierbei, dass ein Produktionsstamm mit Vierfach-Proteasedeletion mit einem Produktionsstamm, der die *vib-1*-Deletion trägt, verglichen werden sollte. Im Fokus der Auswertungen lagen die Proteaseaktivität sowie die Produktausbeute.

3.5.3 Vergleich von Produktionsstämmen mit $\Delta vib-1$ und Stämmen mit Deletionen von vier Proteasegenen

In diesem Versuch sollte untersucht werden, welche Strategie der Proteasebeseitigung zu einer höheren Ausbeute an heterologem Fusionsprotein führt. Dazu sollte ein Produktionsstamm mit $\Delta vib-1$ -Hintergrund mit einem Stamm mit den Deletionen $\Delta spr-7$, $\Delta apr-9$, $\Delta apr-3$ und $\Delta NCU00263$ verglichen werden. Für den letztgenannten musste zunächst der Empfängerstamm konstruiert werden. In mehreren Kreuzungsschritten wurde zunächst ein Stamm generiert mit dem Genotyp *his-3⁻*, *exo-1*, $\Delta spr-7$, $\Delta apr-9$, $\Delta apr-3$ und $\Delta NCU00263$ (siehe Material und Methoden). Alle Deletionen wurden mittels PCR bestätigt.

Ein weiteres Ziel dieses Versuches war der Wechsel des $13\times myc$ -tags auf einen *his₁₀*-tag. Neben dem geringeren Molekulargewicht (15,5 kD beim $13\times myc$ -tag und 1,5 kD beim *his₁₀*-tag) wird die bislang zu hohe Sensitivität des Nachweises im Western Blot verringert und gleichzeitig kann das Produkt mittels Affinitätschromatographie aus dem Kulturüberstand isoliert werden. Basierend auf dem modularen Plasmid DHP-016 (siehe Material und Methoden) wurde zu diesem Zweck eine neue Expressionskassette erzeugt (Abb. 3.30), welche neben dem *his₁₀*-tag den *PccgInr*-Promotor enthielt. Dieser hatte im Promotorvergleich zu den höchsten Mengen an Fusionsprotein im Kulturüberstand geführt.

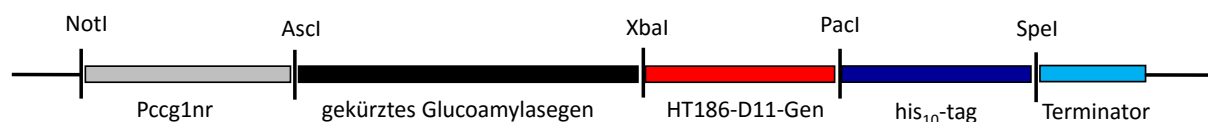


Abb. 3.30: Schematische Darstellung der Expressionskassette mit dem neuartigen Promotor *PccgInr* und *his₁₀*-tag. Jedes essentielle Element kann durch die Kombination aus zwei Restriktionsschnittstellen ausgewechselt werden.

Die Expressionskassette wurde für die Transformation von DHN-157 (*his-3⁻*, *exo-1*, $\Delta vib-1$, Δvvd) und DHN-231 (*his-3⁻*, *exo-1*, $\Delta spr-7$, $\Delta apr-9$, $\Delta apr-3$ und $\Delta NCU00263$) eingesetzt.

Transformanten wurden in einer Einzelsporisolierung aufgereinigt und mittels PCR überprüft (siehe Material und Methoden).

Die hierbei erzeugten Stämme wurden in einem parallelen Bioreaktorsystem jeweils in zwei verschiedenen Medien zur selben Zeit kultiviert. Neben dem bereits etablierten und optimierten Bird Medium (definiertes Minimalmedium) sollte auch ein Medium mit komplexen Bestandteilen verwendet werden. Dieses enthielt in verschiedenen Konzentrationen Malzextrakt, Hefeextrakt und Trypton (aus Casein). Dieses Medium basiert auf der Zusammensetzung des YM-Mediums 200 des *American Type Culture Collection* (ATCC), die Konzentrationen wurden für eine erhöhte Proteinproduktion empirisch erhöht. Beide Medien enthielten identische Konzentrationen der Puffersubstanz MES sowie Maltose (siehe Material und Methoden). Da Malzextrakt zu ca. 70 % aus Maltose besteht, wurde im Komplexmedium die Maltosekonzentration entsprechend angepasst, sodass beide Medien eine Maltosekonzentration von 20 g/L enthielten. Der Hintergrund für die Verwendung des Komplexmediums war die Vermutung, dass Bestandteile wie Vitamine oder Aminosäuren die Proteinproduktion positiv beeinflussen könnten oder die Proteaseaktivität verringert wird.

In Vorversuchen wurde beobachtet, dass Kulturen in Komplexmedium wesentlich schneller wachsen. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die Kulturen daher gestaffelt angeimpft, sodass die Kulturen relativ gesehen in den gleichen Wachstumsphasen beprobt werden konnten. Für den Vergleich der genetischen Hintergründe wurden die Stämme DHN-252 (*his-3⁺::Pccglnr-gla_I-ht186-10xhis, exo-1, Δvib-1, Δvvd*) und DHN-270 (*his 3⁺::Pccglnr-gla_I-ht186-10xhis, exo-1, Δspr-7, Δapr-9, Δapr-3, ΔNCU00263*) in Bird und Komplexmedium kultiviert (Abb. 3.31). Bislang wurden für alle Kultivierungen Rushton-Rührblätter verwendet. Es wurde jedoch vermutet, dass dieser Rührertyp ebenfalls einen Einfluss auf das Freisetzen der Proteasen haben könnte, indem das Myzel durch zu hohe Scherkräfte lysiert und dadurch intrazelluläre Proteasen ins Medium gelangen. Daher wurden ab sofort Schrägblattrührer verwendet, welche häufig in der Zellkulturtechnik verwendet werden, da hier schonende Kultivierungsbedingungen notwendig sind.

Beide Stämme zeigten ein grundlegend unterschiedliches Wachstum auf. Ausgehend von den Abgasdaten wuchs DHN-252 atypisch, da die XCO₂-Kurve zwei anstatt eines Peaks aufwies (Abb. 3.31 B). Dieses Wachstumsverhalten konnte bei beiden Medien beobachtet werden. Die Summe an gebildetem CO₂ zeigte, dass das Wachstum sowohl vor als auch nach diesem Zeitpunkt exponentiell verlief. Hiervon abgesehen wuchsen beide Stämme sehr ähnlich, insbesondere zu Beginn der Kultivierung (bis 10 h bei Komplexmedium und 20 h bei Bird

Medium) waren die Kurvenverläufe identisch. Ein möglicher Grund für diesen Kurvenverlauf könnte die Verwendung der Schrägblattrührer sein, die zum ersten Mal ihre Anwendung fanden.

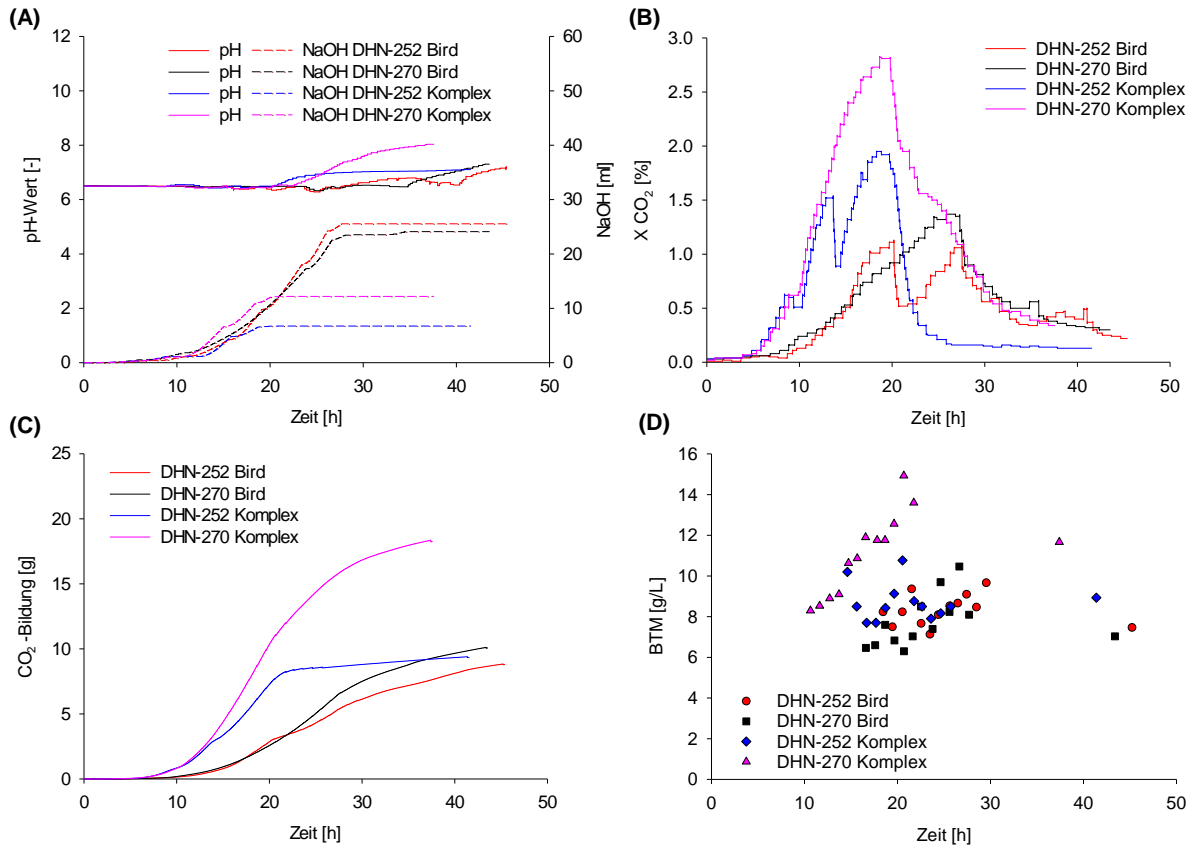


Abb. 3.31: Wachstum in Komplexmedium verläuft stammübergreifend wesentlich schneller als in Bird Medium. Die Stämme DHN-252 (*his-3⁺::Pccg1nr-glat-ht186-10xhis, exo-1, Δvib-1, Δvvd*) und DHN-270 (*his-3⁺::Pccg1nr-glat-ht186-10xhis, exo-1, Δspr-7, Δapr-9, Δapr-3, ΔNCU00263*) wurden in einem parallelen 1 L-Bioreaktorsystem (800 ml Arbeitsvolumen) bei 30 °C in optimiertem Bird Medium und Komplexmedium mit 20 g/L Maltose kultiviert. Der Gelöstsauerstoffwert wurde bei Erreichen von 20 % durch Regulation der Rührerdrehzahl konstant gehalten. Der pH-Wert wurde mit einer 2 M NaOH-Lösung auf pH 6,5 geregelt (A). Der Anteil von Kohlenstoffdioxid (B) in der Abluft wurde gemessen und die gebildete CO₂-Menge zu jedem Zeitpunkt berechnet (C). Zusätzlich wurde die Biotrockenmasse bestimmt (D). Für die Kultivierung wurden erstmals Schrägblattrührer verwendet.

Der Vergleich der beiden Medien zeigt, dass das Wachstum bei beiden Stämmen in Komplexmedium wesentlich schneller verlief als in Bird Medium. Es wurden wesentlich höhere Mengen CO₂ gebildet (gut an DHN-270 zu erkennen) und die Verstoffwechselung des Substrates geschah schneller (höhere XCO₂-Werte). Die Kultivierung bei Komplexmedium war bereits 7 h früher beendet, obwohl die gleiche Zuckermenge im Medium enthalten war. Die Pufferung war ebenfalls unterschiedlich, da bei Bird Medium wesentlich mehr Lauge für die pH-Wert-Regelung verbraucht wurde. Hier zeigt sich jedoch kein Trend, ob ein Stamm zu

einem höheren Laugenverbrauch führt. DHN-270 erreichte eine wesentlich höhere Biomasse in Komplexmedium als DHN-252. Die Auswirkung des Mediums auf die Biomassebildung wird deutlich bei DHN-270, welcher in Komplexmedium ca. 50 % mehr Biomasse gebildet hat als in Bird-Medium. Bei DHN-252 kann kein Unterschied bei der Biomasse bei den unterschiedlichen Medien festgestellt werden.

Für alle Kultivierungen kann die maximale spezifische Wachstumsrate μ_{\max} berechnet werden. Aus diesem Kennwert kann abgelesen werden, ob die Unterschiede im Wachstum auf die maximale Wachstumsgeschwindigkeit oder den langsameren Wachstumsbeginn zurückzuführen sind. Hierfür wurde μ_{\max} auf zwei Weisen berechnet: zum einen wurde die Berechnung auf Basis der Biomasse durchgeführt (μ_{\max}), zum anderen auf Basis der gebildeten CO_2 -Menge (μ_{\max, CO_2}). Dies war notwendig, da die Biomasse in dieser Kultivierung stark geschwankt hat und dadurch fehlerbehaftet war. Diese Kennzahlen sind daher nur innerhalb der gleichen Berechnung vergleichbar (Tab. 3.7)

Tab. 3.7: Berechnete maximale spezifische Wachstumsraten μ_{\max} der Stämme DHN-252 und DHN-270 in verschiedenen Medien. Die Berechnung wurde sowohl über die Biomasse als auch über die gebildete Menge an CO_2 berechnet.

| Stamm, Medium | μ_{\max} [1/h] | μ_{\max, CO_2} [1/h] |
|------------------|--------------------|---------------------------------|
| DHN-252, Bird | 0,034 | 0,080 |
| DHN-270, Bird | 0,040 | 0,140 |
| DHN-252, Komplex | 0,061 | 0,162 |
| DHN-270, Komplex | 0,054 | 0,182 |

Die μ_{\max} -Werte unterschieden sich erheblich voneinander abhängig von der Methode der Berechnung. Auf Biomasse basierende μ_{\max} -Werte zeigten, dass die maximale spezifische Wachstumsrate in Komplexmedium um ca. 40 % bzw. 80 % höher lag als in Bird Medium. Die maximale spezifische Wachstumsrate der Stämme untereinander unterschied sich jedoch nur minimal. Wurden die CO_2 -Daten verwendet, so waren die Unterschiede der Stämme untereinander wesentlich höher. Auch hier waren die μ_{\max, CO_2} -Werte in Komplexmedium jedoch höher als in Bird Medium. Diese Kennzahlen bestätigten daher das schnellere Wachstum der Stämme in Komplexmedium, ein schnelleres Wachstum von DHN-270 konnte nur teilweise bestätigt werden.

Die Produktion des heterologen Fusionsproteins wurde mittels Western Blot überprüft und die Proteaseaktivität des Überstandes ermittelt (Abb. 3.32). Die analysierten Proben wurden so

ausgewählt, dass sie ungefähr gleichen Wachstumsphasen entsprachen. Um dies zu verdeutlichen, wurden die Signale im Western Blot mittels ImageJ ausgewertet und auf die Abgasdaten bezogen.

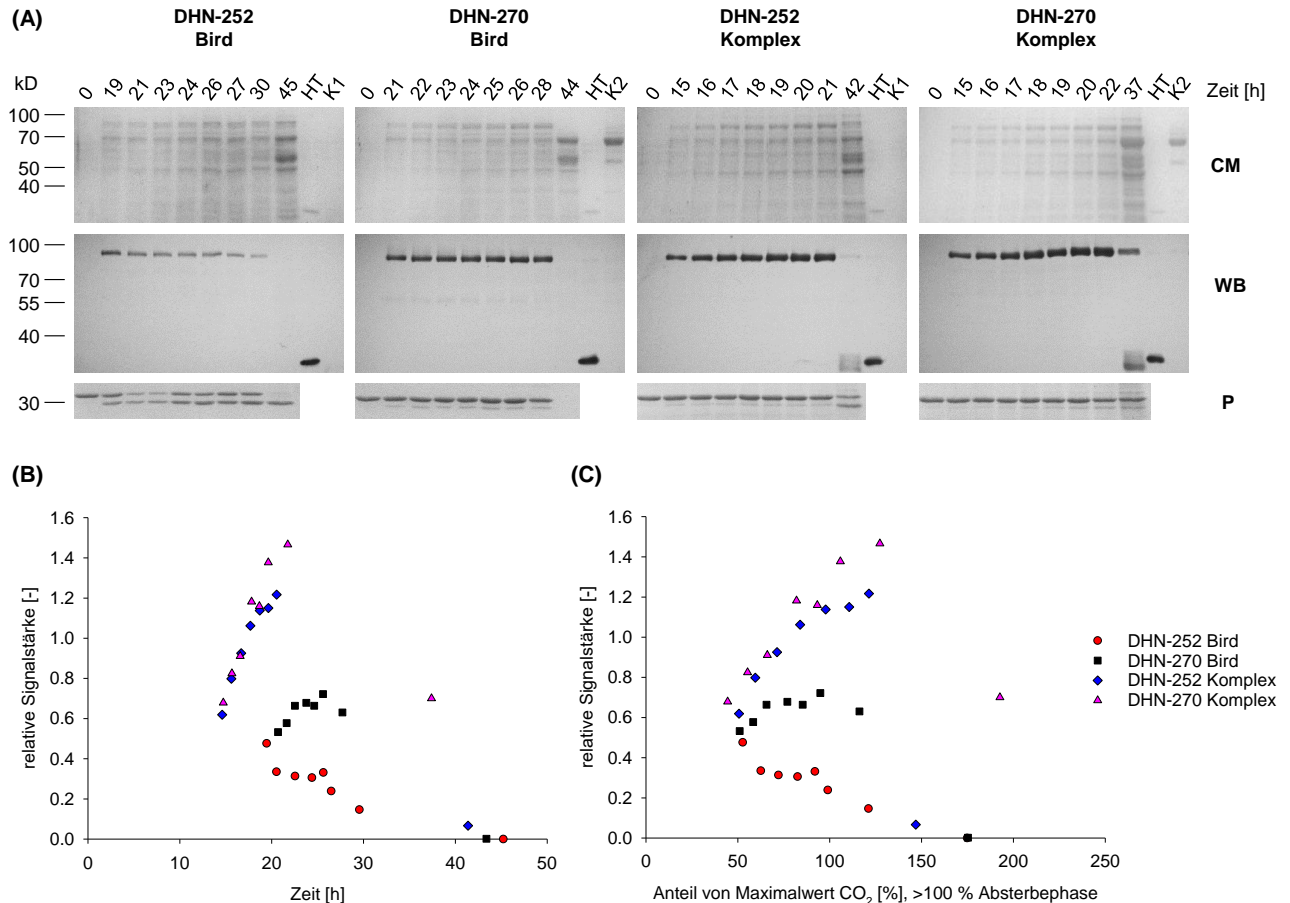


Abb. 3.32: Die höchsten Mengen an heterologem Fusionsprotein wurden in Komplexmedium unter Verwendung des Produktionsstammes mit Deletion von vier Proteasegenen produziert. Die Stämme DHN-252 (*his-3⁺::PccgInr-glat-ht186-10xhis, exo-1, Δvib-1, Δvvd*) und DHN-270 (*his-3⁺::PccgInr-glat-ht186-10xhis, exo-1, Δspr-7, Δapr-9, Δapr-3, ΔNCU00263*) wurden in einem parallelen 1 L-Bioreaktorsystem in optimiertem Bird Medium und Komplexmedium kultiviert. Die Produktion des heterologen Fusionsproteins wurde überprüft (A). Ungefällte Proteine im Überstand wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie-Färbung (CM) analysiert. In einem Western Blot wurde der *his-tag* des Fusionsproteins detektiert (WB). Die Entwicklung erfolgte mittels Anfärbung der Membran mit NBT/BCIP-System. Als Kontrolle wurde HT186-D11 (produziert in *E. coli*, ca. 25 ng) eingesetzt (HT). Als Negativkontrolle wurde Kulturüberstand von Stämmen mit *exo-1, Δvib-1*-Hintergrund (K1) oder nur *exo-1* (K2) verwendet (keine Produktionsstämme). Für den Protease-Assay (P) wurden ungefällte Kulturüberstände mit HT186-D11 (ca. 1 µg) für 24 h bei 30 °C inkubiert. Als Kontrolle wurde der scFv mit Medium (0) inkubiert. Anschließend wurden die Proben in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Ein Fehlen der Bande bei 30 kD weist auf eine Proteaseaktivität hin. Die Western Blot-Membranen wurden grafisch mit der Software ImageJ ausgewertet, die relative Signalstärke berechnet und gegen die Zeit (B) oder die bis dahin ausgestoßene relative Menge an CO₂ (C) bezogen.

Die höchste Menge an Fusionsprotein wurde bei der Kombination aus Komplexmedium und dem Stamm DHN-270 erreicht, welcher auf der neuartigen Strategie der Proteasedefizienz basiert. Die geringsten Mengen wurden bei der Kultivierung von DHN-252 in Bird Medium

erreicht. Dies entspricht der bis hierhin aktuellen Strategie. Der grundlegende Unterschied zwischen diesen beiden Kultivierungen war die verschiedene hohe Proteaseaktivität, welche bei DHN-252 in Bird mit Abstand am höchsten war. An diesem Punkt konnte daher ausgeschlossen werden, dass die Verwendung der Rushton-Rührblätter der Grund für die Freisetzung von Proteasen war, denn die Proteaseaktivität hatte sich zu vorangegangenen Versuchen bei diesem Stamm nicht verändert. Es ist gut zu erkennen, dass die Proteaseaktivität dazu führte, dass produziertes Fusionsprotein anschließend wieder abgebaut wurde. Innerhalb der Wachstumsphasen konnte dies bei allen drei anderen Kombinationen nicht beobachtet werden. Alleine die Einführung des Komplexmediums hat bei DHN-252 zum Ausbleiben der Proteaseaktivität geführt. DHN-270 bildete selbst bei Bird Medium in der Wachstumsphase keinerlei Proteasen. In der Absterbephase konnte bei allen Stämmen Proteaseaktivität beobachtet werden, wodurch das heterologe Protein in allen Fällen zumindest zum Teil abgebaut wurde. Bei DHN-270 waren zwar auch vor Erreichen der Absterbephase geringe Mengen an Abbauprodukt zu erkennen, dennoch konnte mit diesem Stamm mehr heterologes Protein produziert werden.

Der Wechsel des Nachweissystems auf Verwendung des *his10-tags* bei gleichzeitiger Entwicklung mit dem NBT/BCIP-Systems hat funktioniert. Alle Signale waren sehr klar und wurden innerhalb von ca. 10 min Entwicklungszeit erreicht. Die Negativkontrolle zeigte keinerlei Bande auf, alle Signale waren daher spezifisch für das Fusionsprotein.

Ausgehend von dieser Kultivierung würde daher für ein Scale-Up die Wahl auf den Stamm DHN-270 und Komplexmedium fallen, da mehr Produkt in kürzerer Zeit als bei den anderen Kombinationen hergestellt wurde. Ein wichtiger Aspekt bei der Auswahl der endgültigen Bedingungen ist jedoch auch die Frage, ob das Produkt aus dem Kulturüberstand isoliert werden kann. Hierfür sollte die Kultivierung wiederholt werden und der Kulturüberstand für eine Aufreinigung eingesetzt werden.

3.5.4 Isolation des Fusionsproteins aus dem Kulturüberstand für beide Ansätze der Proteasedefizienz

Ziel dieses Versuches war die erstmalige Isolation des heterologen Fusionsproteins GLA_t-HT186-D11 aus Kulturüberstand von *N. crassa*. Dazu wurden die bereits vorher eingesetzten Stämme DHN-252 und DHN-270 in Bird- und Komplexmedium kultiviert und der Kulturüberstand für eine Aufreinigung eingesetzt (Abb. 3.33). Zum einen sollte damit geklärt werden, mit welchem proteasedefizienten Stamm eine höhere Ausbeute erzielt werden kann, zum anderen wurde überprüft, ob *N. crassa*-Kulturüberstand für eine solche Aufreinigung geeignet ist. Für die Aufreinigung wurde eine Metallchelat-Affinitätschromatographie auf Basis von Nickelsepharose durchgeführt, bei welcher Proteine mit *his*-tag spezifisch gebunden werden. Die Ergebnisse dieses Versuches sollten für die Entscheidung herangezogen werden, mit welchem Stamm und Medium ein Scale-Up durchgeführt werden soll.

Die Kultivierung verlief in diesem Ansatz anders als im vorangegangenen Abschnitt, in welchem DHN-252 bei den Abgasdaten zwei Peaks aufwies. In Abb. 3.33 (A) ist bei allen Kurven nur ein Peak zu erkennen, dies entspricht im Vergleich zu den vorangegangenen Kultivierungen dem Normalfall. Es ist deutlich zu erkennen, dass DHN-252 (auf Basis von $\Delta vib-1$) ein verzögertes Wachstum in beiden Medien aufwies. Innerhalb eines Mediums hatten die Stämme ungefähr die gleiche Wachstumsgeschwindigkeit. Sowohl DHN-252 als auch DHN-270 erreichten in Bird Medium ein μ_{\max, CO_2} von ca. 0,26 1/h. In Komplexmedium hat DHN-252 einen μ_{\max, CO_2} -Wert von ebenfalls 0,26 1/h erreicht, DHN-270 ein μ_{\max, CO_2} von 0,3 1/h, dies entspricht einem ca. 15 % höheren Wert. Erneut zeigt es sich, dass in Komplexmedium wesentlich höhere Werte des CO₂-Anteiles in der Abluft (XCO₂) erreicht werden als in Bird Medium. Kombiniert mit den μ_{\max, CO_2} -Werten bedeutet dies, dass die hohen XCO₂-Werte nicht durch unterschiedliche maximale spezifische Wachstumsraten herbeigeführt wurden. Die Biomasse der Stämme in Komplexmedium war wieder um ca. 50 % höher als in Bird Medium (B). Für die Aufreinigung des Produktes wurden die Kulturen zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet, innerhalb eines Mediums können die Stämme allerdings verglichen werden, da die Ernte in gleichen Kultivierungsphasen geschah (A). Die Kulturen in Komplexmedium befanden sich hierbei bereits für 2 h in der Absterbephase.

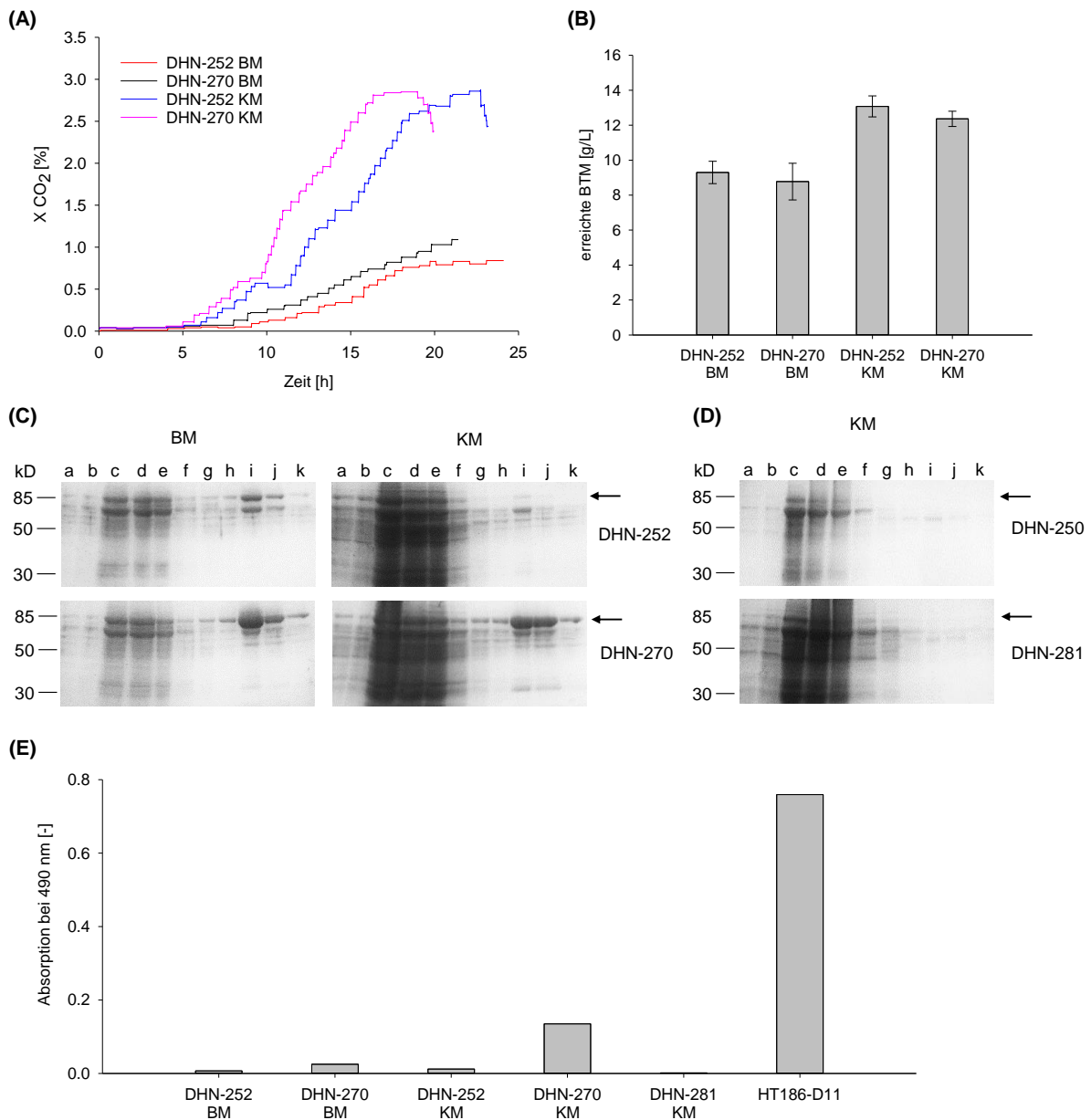


Abb. 3.33: In *N. crassa* produziertes heterologes Protein konnte mittels Affinitätschromatographie über den *his10*-tag isoliert werden. Die Stämme DHN-252 (*his-3⁺::Pccg1nr-glat-ht186-10xhis, exo-1, Δvib-1, Δvvd*) und DHN-270 (*his-3⁺::Pccg1nr-glat-ht186-10xhis, exo-1, Δspr-7, Δapr-9, Δapr-3, ΔNCU00263*) wurden in einem parallelen 1 L-Bioreaktorsystem (800 ml Arbeitsvolumen) bei 30 °C in optimiertem Bird Medium (BM) und Komplexmedium (KM) mit 20 g/L Maltose kultiviert. Der Gelöstsauerstoffwert wurde bei Erreichen von 20 % durch Regulation der Rührerdrehzahl konstant gehalten. Der pH-Wert wurde mit einer 2 M NaOH-Lösung auf pH 6,5 geregelt. Für die Kultivierung wurden Schrägblattrührer verwendet. Der Anteil von Kohlenstoffdioxid (A) in der Abluft wurde gemessen die Biotrockenmasse bestimmt (B). Grundlage für diese Bestimmung war die Biomasse der Proben der letzten zwei Stunden vor der Ernte. Der Kulturüberstand wurde für eine Affinitätschromatographie eingesetzt (C). Als Kontrolle wurde unter identischen Bedingungen Stämme ohne *his10*-tag in Komplexmedium kultiviert: DHN-250 (*his-3⁺::Pccg1nr-glat-ht186-13×myc, exo-1, Δvib-1, Δvvd*) und DHN-281 (*his-3⁺::Pccg1nr-glat-ht186-13×myc, exo-1, Δspr-7, Δapr-9, Δapr-3, ΔNCU00263*) (D). Bei der Aufreinigung wurden folgende Fraktionen erzeugt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und über Coomassie-Färbung analysiert: (a) Überstand, (b) Überstand nach Zentrifugation, (c) gefällte, konzentrierte Proteine, (d) gefällte Proteine nach Dialyse, (e) Durchlauf, (f) Waschfraktion 10 mM Imidazol, (g) Waschfraktion 20 mM Imidazol, (h) Waschfraktion 30 mM Imidazol, (i) Elutionsfraktion 1, (j) Elutionsfraktion 2 und (k) Elutionsfraktion 3. Die Pfeile zeigen die berechnete Laufhöhe des Fusionsproteins an. Die Elutionsfraktionen 1 wurden in einem ELISA auf Antigenbindung untersucht (E). Als Positivkontrolle wurde HT186-D11 (10 µg/ml, produziert in *E. coli*) verwendet.

Aus allen Kulturen konnte erfolgreich das vollständige Fusionsprotein isoliert werden (C, Bahnen i bis k, siehe Pfeil). Zwischen den Kulturen gab es allerdings große Unterschiede. Prinzipiell wurden mit DHN-270 wesentlich höhere Ausbeuten an vollständigem Fusionsprotein erhalten als mit DHN-252. Bei letztgenanntem Stamm konnte in Komplexmedium weniger Fusionsprotein isoliert werden als in Bird Medium. Bei DHN-270 wurde eine ähnlich große Proteinmenge in beiden Medien aufgereinigt. Bei beiden Stämmen konnten Abbauprodukte des Fusionsproteins nachgewiesen werden, allerdings wies DHN-252 einen höheren prozentualen Anteil an Abbauprodukten auf als DHN-270. Zusätzlich ist zu erwähnen, dass bei DHN-270 in Komplexmedium ein Abbauprodukt bei 30 kD zu erkennen war. Hierbei könnte es sich um HT186-D11-his₁₀ handeln, da das berechnete Molekulargewicht ebenfalls 30 kD entspricht.

Um festzustellen, ob es sich bei dem aufgereinigten Protein tatsächlich um das heterologe Fusionsprotein handelte, wurden zusätzlich zwei Kultivierungen durchgeführt, in welchem Stämme mit gleichem genetischen Hintergrund, jedoch dem $13 \times myc\text{-tag}$ anstatt des *his*₁₀-tags, verwendet wurden (DHN-250 und DHN-281). Die Kulturüberstände wurden ebenfalls für eine Affinitätschromatographie eingesetzt (D), um zu überprüfen ob nicht *N. crassa*-eigene Proteine aufgereinigt werden. Die Elutionsfraktionen enthielten jedoch kaum unspezifisch gebundene Proteine bei beiden Stämmen. Das 85 kD große Protein (C) kann daher als das heterologe Fusionsprotein GLA-1-HT186 identifiziert werden.

Ein weiterer wichtiger Aspekt war die Frage, ob das produzierte Fusionsprotein aktiv ist, also das Antigen MUC1 (Muzin, Brustkrebsmarker) binden kann. Hierfür wurde ein ELISA durchgeführt, in welchem die Elutionsfraktionen 1 der Aufreinigung verwendet wurden (E). Als Positivkontrolle wurde HT186-D11 eingesetzt, welcher in *E. coli* produziert wurde. Im ELISA konnte eindeutig gezeigt werden, dass das produzierte Protein aktiv ist. Im Vergleich zur Positivkontrolle jedoch ist dieses Signal verhältnismäßig gering, obwohl die Fraktionen große Mengen an Fusionsprotein enthielten. Insbesondere der Aktivitätsunterschied zwischen DHN-270 in Bird- und Komplexmedium war höher als erwartet. Die Signale der Elutionsfraktionen von DHN-270 waren wesentlich höher als die von DHN-252. Entweder ist nur ein geringer Anteil der produzierten Proteine aktiv oder der ELISA unterliegt einem systematischen Fehler. Eine Möglichkeit könnte sein, dass der scFv aus sterischen Gründen nicht an das Antigen binden kann, da er durch das *Carrier*-Protein an der Bindung gehindert wird.

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, dass das heterologe Fusionsprotein über den *his₁₀-tag* aus dem Kulturüberstand isoliert werden kann. Bei DHN-270, welcher auf der Deletion von einzelnen Proteasegenen basiert, konnten wesentlich höhere Ausbeuten erzielt werden als bei DHN-252, welcher auf $\Delta vib-1$ basiert. Die Änderung der Strategie bezüglich der Proteasedefizienz war daher ertragssteigernd. Durch den Einsatz von Komplexmedium konnte wesentlich schnelleres Wachstum und eine höhere Biomassekonzentration erreicht werden und wurde daher dem definierten Bird Medium in folgenden Versuchen vorgezogen. Die Prozessoptimierung im 1 L-Maßstab war hiermit abgeschlossen. Im nächsten Schritt sollte ein Scale-Up auf 10 L durchgeführt werden und überprüft werden, ob es zu Veränderungen in den Wachstumscharakteristika kommt. Hierbei sollte in einem letzten Schritt ein Batch-Verfahren mit einem Fed-Batch-Verfahren exemplarisch verglichen werden. Ziel des Fed-Batch-Verfahrens ist es, die Wachstumsphase zu verlängern, indem die Wachstumsgeschwindigkeit herabgesetzt wird und somit eine größere Produktausbeute zu erhalten. Dafür wurde der Stamm DHN-270 verwendet, da dieser zu wesentlich höheren Ausbeuten als DHN-252 geführt hat und das Wachstumsverhalten robuster war ohne große Variabilität bei den Abgasdaten. Dies führt zu einer besseren Reproduzierbarkeit und einem verlässlicheren Prozess.

3.6 Scale-Up auf 10 L-Maßstab

3.6.1 Vergleich von Wachstum in 1 L- und 10 L-Maßstab

Nachdem das Wachstum im 1 L-Maßstab ausführlich untersucht und die Produktion optimiert wurde, sollte der Kultivierungsmaßstab erhöht werden. Das Ziel war es, eine Produktion in einem 10 L-Edelstahlreaktor mit dem Stamm DHN-270 (*his 3⁺::PccgInr-gla-ht186-10xhis, exo-1, $\Delta spr-7$, $\Delta apr-9$, $\Delta apr-3$, $\Delta NCU00263$*) in Komplexmedium durchzuführen. Dabei sollten die meisten Kultivierungsparameter identisch sein zu dem kleinen Maßstab (Regulation auf pH 6,5 mit 2 M NaOH, gleiche relative Begasungsrate, Gelöstsauerstoffkonzentration bei 20 % und identische Sporenkonzentration von 1×10^6 Sporen/ml, 30 °C). Die Anfangsrührergeschwindigkeit wurde auf 100 rpm festgelegt, da bei diesem Wert laut Erfahrung eine ausreichende Durchmischung zu Kultivierungsbeginn gewährleistet ist. In einer ersten Kultivierung wurden hauptsächlich Online-Daten wie Abgasdaten generiert und mit den Ergebnissen im kleinen Maßstab verglichen (Abb. 3.34). Dazu wurden die Daten aus Abb. 3.33 der Kultivierung von DHN-270 in Komplexmedium verwendet. Es ist zu beachten,

dass im kleinen Maßstab Schrägblattrührer verwendet wurden, im großen Maßstab ein Rushton-Rührer.

Im 9 L-Maßstab sank der Gelöstsauerstoff (Abb. 3.34, A) zu Beginn der Kultivierung langsamer ab als im 0,8 L-Maßstab und erreichte erst 2 h später die Regulationsgrenze von 20 %. Der Grund hierfür liegt in den verschiedenen Verhältnissen von Volumen der Flüssigphase zur Rührergröße, wodurch der Sauerstoffübergang unterschiedlich ist. Nach Erreichen der Regulationsgrenze war die Regulation im 10 L-Reaktor stabiler als im kleinen Reaktor. Nach ca. 11 h kam es zu größeren Ausschlägen, anschließend kehrt der Wert auf 20 % zurück. Bei den Rührergeschwindigkeiten (B) zeigte sich die gleiche Tendenz. Da verschiedene Rührertypen benutzt werden mussten, ist ein absoluter Vergleich nicht möglich. Der Maximalwert wurde ungefähr zum gleichen Zeitpunkt nach ca. 18 h erreicht. In beiden Systemen wurde der pH-Wert (C) durchgängig stabil bei pH 6,5 gehalten. Die relative Menge an NaOH bezogen auf das Gesamtvolumen war sehr ähnlich. Auch die Abgasdaten (D, E) sahen sehr ähnlich aus. Prinzipiell ist zu erkennen, dass die Messhäufigkeit im großen Maßstab wesentlich höher war. Sowohl beim Sauerstoff- als auch Kohlenstoffdioxidanteil in der Abluft zeigten sich jedoch auch Unterschiede auf. Im 10 L-Reaktor wurde nach 16 h das Minimum bzw. Maximum erreicht, anschließend blieben die Werte für nahezu 6 h ungefähr konstant. Eine genauere Analyse zeigte jedoch, dass zum Beispiel beim Kohlenstoffdioxidanteil dieser nach 16 h leicht abfiel, um anschließend wieder leicht anzusteigen. Erst nach 22 h fielen die XCO_2 -Werte deutlich ab und die Absterbephase begann. Im kleinen Maßstab fielen die Werte nach Erreichen des Minimums bzw. Maximums sofort wieder ab. Abgesehen von diesem Unterschied setzte die Absterbephase ungefähr zur gleichen Zeit ein. Ein großer Unterschied zwischen den Systemen war die gemessene Biomasse (E), die im kleinen Maßstab fast doppelt so hoch war wie im großen Maßstab trotz gleicher Wachstumsphasen. Hierbei gilt es zu ermitteln, ob es sich hierbei um einen tatsächlichen Unterschied in der Biomasse handelt oder ob die Probenahme in einem der beiden Systeme fehlerbehaftet war. Eine Berechnung der maximalen spezifischen Wachstumsrate basierend auf der gebildeten CO_2 -Menge ergab für beide Maßstäbe ein $\mu_{\text{max,CO}_2}$ von 0,3 1/h für den Zeitraum 10 bis 16 h. Abgesehen vom Biomasseunterschied änderte die Erhöhung des Kultivierungsmaßstabs nicht das Wachstumsverhalten des Produktionsstammes DHN-270. Auch der Phänotyp der Kulturen war in beiden Maßstäben gleich, es hat sich fein verteiltes Myzel gebildet (Daten nicht gezeigt).

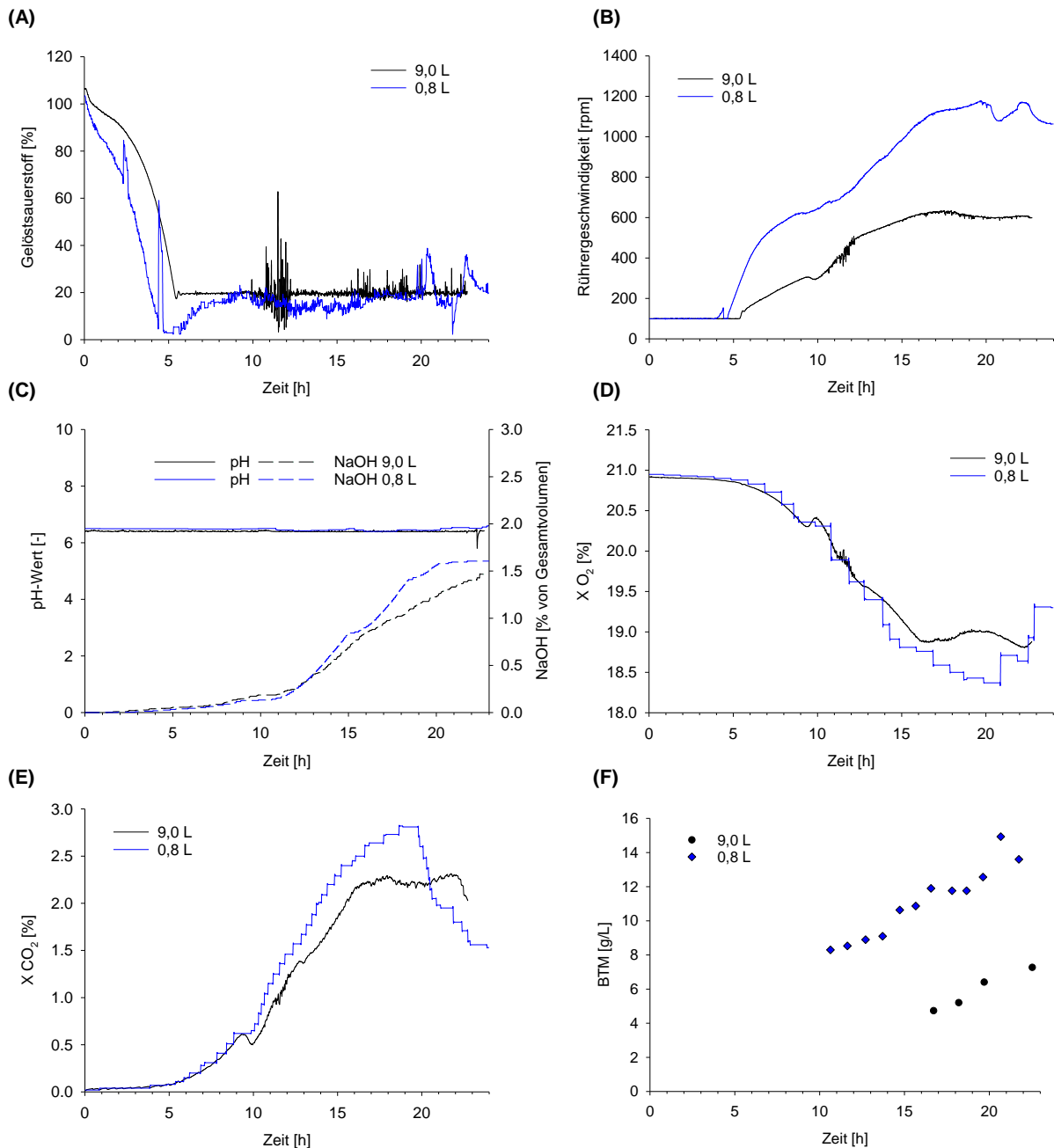


Abb. 3.34: Mit Ausnahme der gemessenen Biomasse war das Wachstum nach einem Scale-Up zu Kultivierungen im kleinen Maßstab sehr ähnlich. Der Produktionsstamm DHN-270 (*his-3⁺::Pccglnr-glat-ht186-10xhis, exo-1, Δspr-7, Δapr-9, Δapr-3, ΔNCU00263*) wurde in einem regulierten 10 L-Bioreaktorsystem (9,0 L Arbeitsvolumen) bei 30 °C in Komplexmedium mit Maltose kultiviert. Das Wachstum der Kultur nach dem Scale-Up (9,0 L) wurde mit der entsprechenden Kultivierung aus Abschnitt 3.5.4 verglichen (0,8 L). Der Gelöstsauerstoffwert (A) wurde bei Erreichen von 20 % konstant gehalten und der Startwert der Rührerdrehzahl (B) betrug 100 rpm. Der pH-Wert (C) wurde mit 2 M NaOH auf pH 6,5 geregelt. Die Menge an NaOH wurde auf das gesamte Reaktorvolumen umgerechnet. Der Anteil von Sauerstoff (D) und Kohlenstoffdioxid (E) in der Abluft wurde gemessen. Die Biotrockenmasse (F) wurde ebenfalls bestimmt.

3.6.2 Produktion bei Batch- und Fed-Batch-Verfahren

Im vorangegangenen Abschnitt wurde ein Scale-Up in einem Batch-Verfahren durchgeführt. Dabei wurde im 10 L-Maßstab das gleiche Wachstumsverhalten wie im kleinen Maßstab festgestellt (vergleichbares Atmungsverhalten und Menge an zugegebener Lauge zur Regulation des pH-Wertes). Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob mit *N. crassa* ein Fed-Batch-Verfahren im 10 L-Maßstab möglich ist. Dazu wurden eine Batch- und eine Fed-Batch-Kultivierung parallel durchgeführt. Zum einen sollte untersucht werden, ob die Wachstumsgeschwindigkeit des Pilzes durch die Limitierung der C-Quelle gesteuert werden kann. Zum anderen sollte überprüft werden, ob sich die Ausbeute durch eine Fed-Batch-Kultivierung signifikant erhöhen lässt. Die Kulturüberstände beider Kultivierungen wurden nach der Ernte für eine Affinitätschromatographie eingesetzt, um das heterologe Fusionsprotein zu isolieren.

In einem Fed-Batch-Verfahren wird nach der Batch-Phase dem Reaktor weiteres Substrat in hinzugegeben (siehe Einleitung). Das Ziel eines Fed-Batch-Verfahrens ist die Verlängerung der Wachstums- und somit der Produktbildungsphase. In diesem Fall soll dies durch das zusätzliche Herabsetzen der spezifischen Wachstumsrate geschehen, welche über die Limitierung der C-Quelle gesteuert wird. Diese Limitierung wird durch langsame Zugabe der Feedinglösung erreicht, deren C-Quelle nicht für das Erreichen der maximalen spezifischen Wachstumsrate ausreicht. Für die Aufstellung eines Fed-Batch-Verfahrens wird eine Anfangsfeedrate F_0 berechnet sowie eine Wachstumsgeschwindigkeit μ_{set} festgelegt. Hierfür werden die maximale Wachstumsgeschwindigkeit μ_{max} sowie der Ertragskoeffizient $Y_{X/S}$ benötigt (Berechnung siehe Material und Methoden). Ausgehend vom μ_{max} -Wert wird eine niedrigere Wachstumsgeschwindigkeit festgelegt, in diesem Fall 20 % von μ_{max} . Da im vorangegangenen Abschnitt nicht genügend Biomasse-Daten generiert wurden, wurde auf Daten der Kultivierung im 0,8 L-Maßstab zurückgegriffen (Abb. 3.33). Ausgehend von der Biomasse wurde ein μ_{max} von 0,054 1/h berechnet. Im Vergleich zu Kultivierungen in Bird Medium erschien dieser Wert jedoch zu niedrig (Werte von ca. 0,1), insbesondere da das Wachstum im Komplexmedium wesentlich schneller als in Bird Medium verläuft. Daher wurde eine Neuberechnung auf Basis der CO_2 -Bildung durchgeführt in der Zeit zwischen 17 und 20 h (abweichend von der Berechnung in Abschnitt 3.5.3). Da diese Werte auf Online-Daten basieren, sind sie wesentlich genauer als Biomassedaten und führten zu einem $\mu_{\text{max,CO}_2}$ von 0,15 1/h. Dieser Wert erschien realistischer und wurde für die Feedberechnung eingesetzt.

Verwendete Kultivierungskennzahlen sowie die Feeding-Parameter sind Tab. 3.8 zu entnehmen. Die Feeding-Dauer war zunächst für 24 h vorgesehen.

Tab. 3.8: Berechnung der Anfangsfeedrate F_0 . Für die Berechnung werden der Ertragskoeffizient $Y_{X/S}$, die maximale Wachstumsgeschwindigkeit μ_{\max, CO_2} , die eingestellte Wachstumsgeschwindigkeit μ_{set} , die erwartete CO_2 -Bildung bei Feedbeginn, das Volumen des Reaktors und die Konzentration der Feedinglösung benötigt. Für die Umrechnung von F_0 wurde eine Dichte von 1,08 g/mL angenommen (berechnet auf Basis der Dichte der Maltoselösung).

| Kennzahl | Wert |
|---|---|
| $Y_{X/S}$ | 0,45 g CO_2 /g Substrat |
| μ_{\max, CO_2} | 0,15 1/h |
| μ_{set} | 0,03 1/h |
| CO_2 zu Feedbeginn ($c_{x,0}$) | 10,39 g CO_2 /L |
| Volumen des Reaktors (V_0) | 9,0 L |
| Konzentration der Feedinglösung (c_s) | 200 g Substrat /L |
| F_0 | 31,89 mL/h |
| F_0 | 34,4 g Feedinglösung /h |

Für einen Vergleich der beiden Kultivierungsverfahren wurden parallel in zwei 10 L-Bioreaktoren Kultivierungen mit DHN-270 (*his 3⁺::Pccglnr-gla-ht186-10xhis, exo-1, Δ spr-7, Δ apr-9, Δ apr-3, Δ NCU00263*) in Komplexmedium mit Maltose durchgeführt (Abb. 3.35). Das Feeding wurde manuell nach ca. 18 h gestartet und war ursprünglich für eine Laufzeit von 24 h vorgesehen. Die Feedinglösung enthielt sämtliche Bestandteile des Komplexmediums in konzentrierter Form, sodass es zu keinen Limitierungen von anderen Medienbestandteilen kommen sollte. Das Substrat in der Feedinglösung stellten reduzierende Zucker hauptsächlich in Form von Maltose dar. Aufgrund fallender Kohlenstoffdioxidanteile in der Abluft nach ca. 23 h wurde vermutet, dass die Feedrate für die angestrebte spezifische Wachstumsrate zu gering eingestellt war. Daher wurde die Feedrate angepasst, sodass μ_{set} auf 0,04 1/h angehoben wurde, wodurch sich die Laufzeit auf insgesamt 22 h reduzierte. Die zu dem Zeitpunkt aktuelle Feedrate von 40 g/h wurde bei diesem Wert belassen.

Innerhalb der Batch-Phasen verliefen beide Kultivierungen nahezu identisch. Sowohl der Verlauf der Gelöstsauerstoffkonzentration (Abb. 3.35 A) als auch die Rührergeschwindigkeit (B) waren gleich. Auch der Verlauf der Laugenzugabe (C) war sehr ähnlich. Der Verlauf des Sauerstoffanteils (D) in der Abluft war ebenfalls tendenziell gleich. Bis 16 h fiel dieser Wert,

anschließend stieg er kurz an und fiel danach weiter. Der respiratorische Quotient (E), über welchen Rückschlüsse auf die verwendete C-Quelle gezogen werden können, lag zwischen 7 und 14 h bei ca. 1 und stieg danach auf ca. 1,2 an. Auch die Verläufe von Biomasse und Substrat waren in diesen Phasen identisch (F).

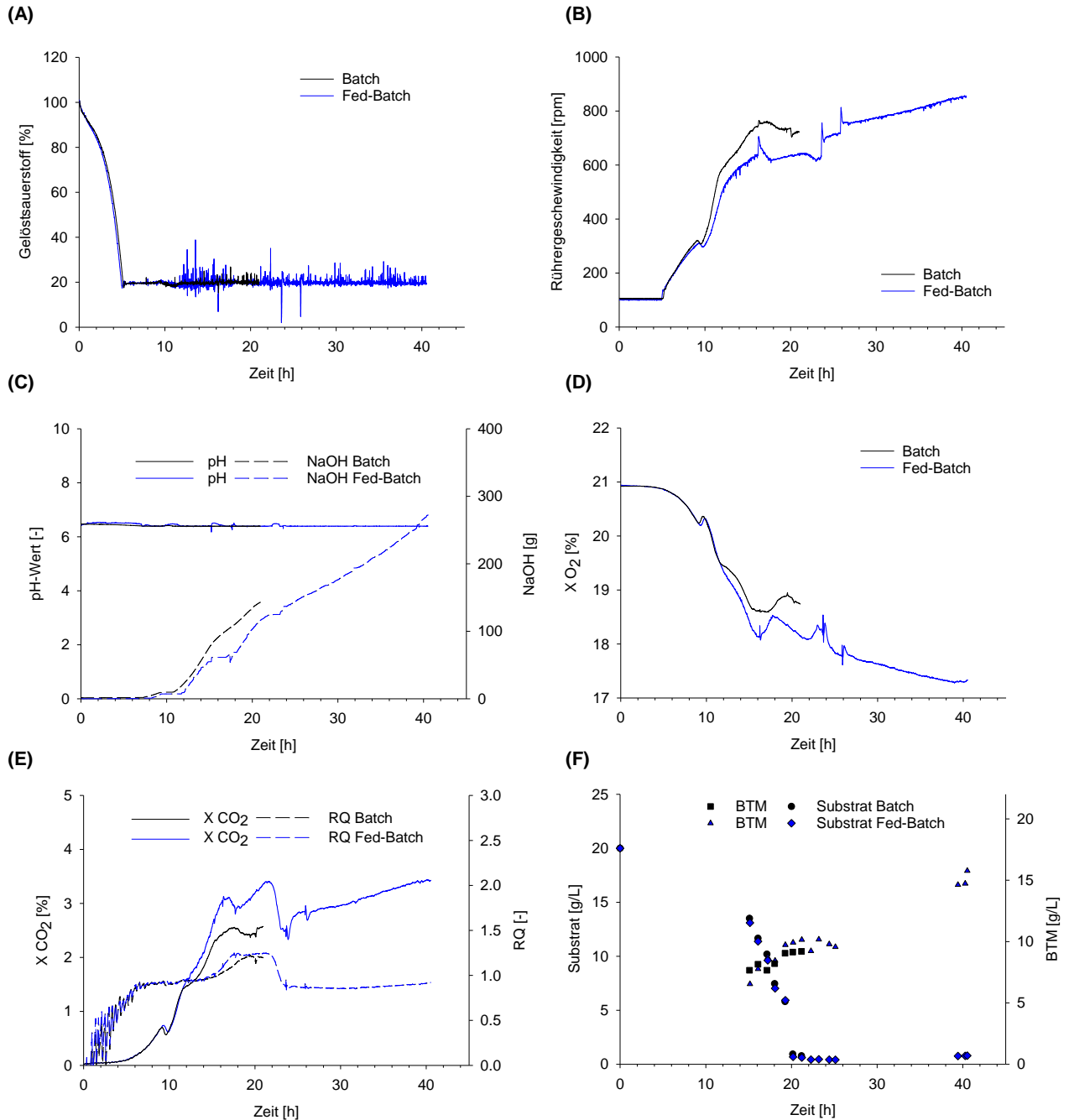


Abb. 3.35: Fed-Batch-Verfahren sind mit *N. crassa* möglich, das Wachstum ist steuerbar. Der Produktionsstamm DHN-270 (*his-3⁺::PccgInr-glat-ht186-10xhis*, *exo-1*, Δ *spr-7*, Δ *apr-9*, Δ *apr-3*, Δ *NCU00263*) wurde in zwei regulierten 10 L-Bioreaktorsystem (9 L Arbeitsvolumen) bei 30 °C in Komplexmedium mit Maltose kultiviert. Es wurde ein Batch-Verfahren mit einem Fed-Batch-Verfahren verglichen. Der Gelöstaerstoffwert (A) wurde bei Erreichen von 20 % konstant gehalten und der Startwert der Rührerdrehzahl (B) betrug 100 rpm. Der pH-Wert (C) wurde mit 2 M NaOH auf pH 6,5 geregelt. Der Anteil von Sauerstoff (D) und Kohlenstoffdioxid (E) in der Abluft wurde gemessen. Zusätzlich wurde der respiratorische Quotient RQ berechnet. Die Biotrockenmasse und Substratkonzentration (F) wurden ebenfalls bestimmt.

Für eine Auswertung der Fed-Batch-Phase ist es sinnvoll, alle zusammenhängenden Online-Daten und Offline-Messungen gleichzeitig zu betrachten (Abb. 3.36).

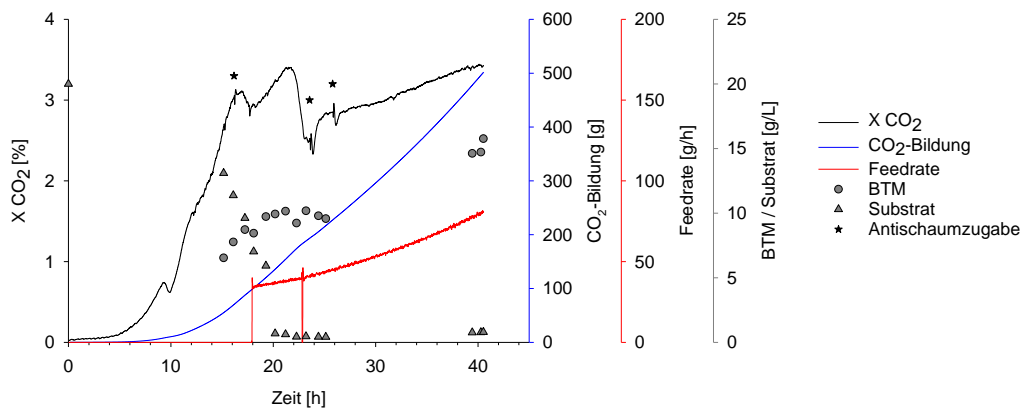


Abb. 3.36: Auswertung der Fed-Batch-Verfahren. Alle Daten gehen auf die Kultivierung in Abb. 3.35 zurück.

Der X_{CO_2} -Kurve ist eindeutig zu entnehmen, dass Fed-Batch-Verfahren mit *N. crassa* generell möglich sind. In der Batch-Phase (bis 18 h) zeigt diese Kurve eine wesentlich höhere exponentielle Steigung auf als in der späten Fed-Batch-Phase (24-40 h), obwohl auch hier exponentielles Wachstum zu erkennen ist. Die maximale spezifische Wachstumsrate in der Batch-Phase betrug 0,331 1/h (auf CO_2 -Basis) und war damit doppelt so hoch wie erwartet. Die Kurve der CO_2 -Bildung zeigt klar zwei Abschnitte auf mit einer Änderung der exponentiellen Steigung bei 24 h. Auch die Substratlimitierung hat funktioniert, da nach 20 h das Substrat konstant bei sehr niedrigen Werten nachgewiesen wurde. Die Biomasse konnte während des Feedings von 9 g/L auf 14 g/L erhöht werden. Der respiratorische Quotient (Abb. 3.35 E) stieg mit Ende der Batch-Phase nach 18 h auf einen Wert von 1,3, fiel mit Beginn der späten Feedingphase (nach 24 h) erneut auf 1,0 und blieb konstant bis zum Ende der Kultivierung. Die maximale spezifische Wachstumsrate in der Fed-Batch-Phase entsprach 0,053 1/h, dies entspricht ca. 17 % des maximalen Wertes und liegt ungefähr im Bereich des eingestellten prozentualen μ_{set} -Wertes (27 % nach Anpassung).

Dennoch ist der Verlauf in der Feedingphase nicht vollständig typisch für ein Fed-Batch-Verfahren. Es wäre zu erwarten gewesen, dass sich nach Feedbeginn eine Wachstumsgeschwindigkeit einstellt, welche konstant bis zum Ende der Kultivierung eingehalten wird. Dies war allerdings lediglich im Zeitraum von 25-40 h zu erkennen (μ_{max,CO_2} von 0,053 1/h). In den ersten 5 h des Feedings wurde zwar die Wachstumsgeschwindigkeit kurzfristig verringert (μ_{max,CO_2} von 0,132 1/h), nach 21 h brach das Wachstum laut Abgasdaten jedoch ein. Dies war der Zeitpunkt, als der Feed angepasst wurde, da befürchtet wurde, dass

die Feedrate nicht ausreichend hoch gewählt wurde. Erst nach der Anpassung stellte sich der typische Wachstumsverlauf ein. Es ist zu beachten, dass bei Feedbeginn noch ca. 7 g/L Substrat (Maltose und andere reduzierende Zucker) vorhanden war und der Pilz daher noch nicht limitiert war. Ebenfalls zu bemerken ist der Einsatz des Antischaummittels Struktol, welcher mit charakteristischen Kurvenverläufen der XCO₂-Werte einherging.

Die Produktion des Fusionsproteins sowie die Proteaseaktivität wurden für beide Kultivierungen überprüft (Abb. 3.37).

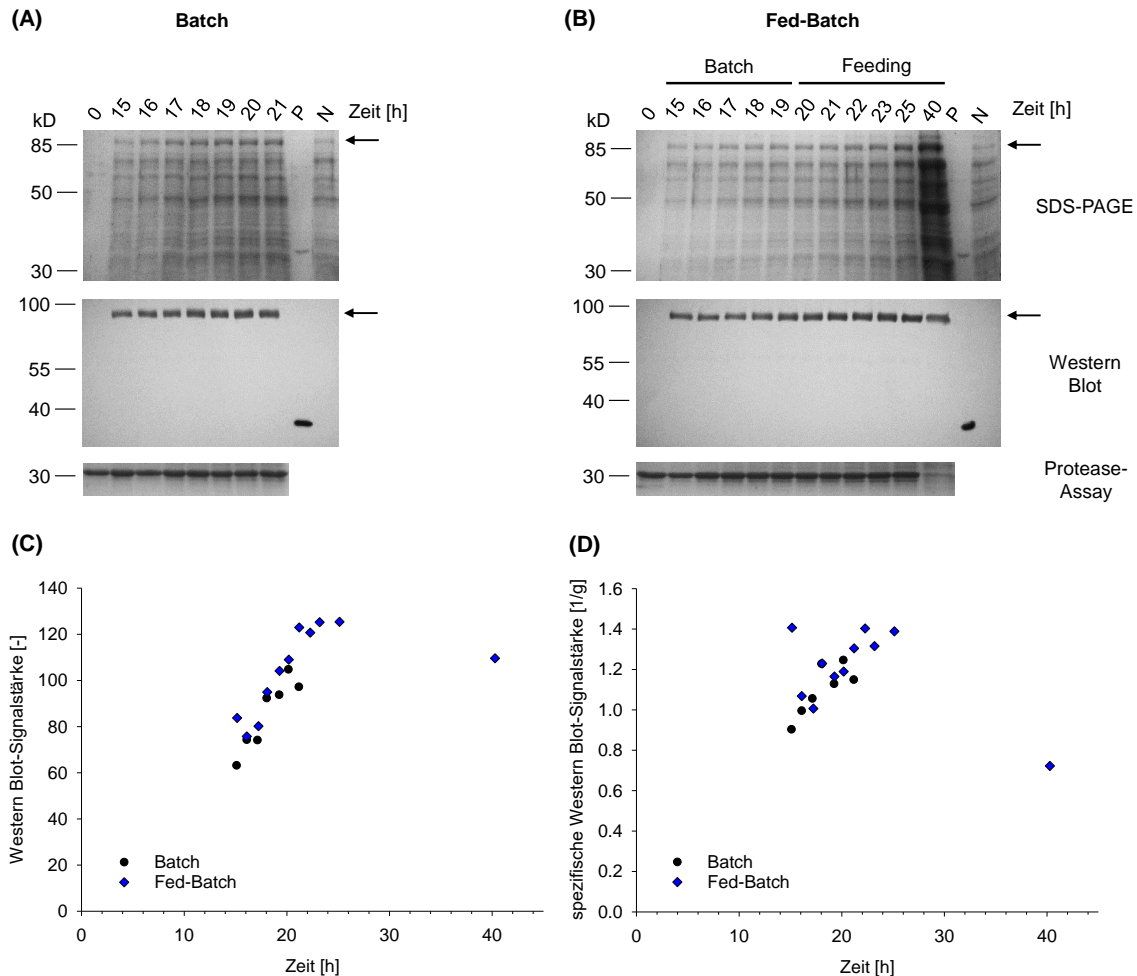


Abb. 3.37: Durch das Fed-Batch-Verfahren konnte die Menge an Fusionsprotein um ca. 25 % gesteigert werden. Verglichen wird die Produktion im Batch-Verfahren (A) mit der Produktion im Fed-Batch-Verfahren (B) der Kultivierung in Abb. 3.35. Ungefällte Proteine im Überstand wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und über Coomassie-Färbung analysiert. In einem Western Blot wurde der *his-tag* des Fusionsproteins detektiert. Die Entwicklung des Western Blots erfolgte mittels Anfärbung der Membran mit NBT/BCIP-System. Als Kontrolle (P) wurde HT186-D11 (produziert in *E. coli*, ca. 25 ng) eingesetzt. Als Negativkontrolle (N) wurde Kulturüberstand des Stammes DHN-281 (*his-3⁺::Pccglnr-glat-ht186-13×myc, exo-1, Δspr-7, Δapr-9, Δapr-3, ΔNCU00263*) verwendet (besitzt keinen *his-tag*). Für den Protease-Assay wurden ungefällte Kulturüberstände mit HT186-D11 (ca. 1 µg) für 24 h bei 30 °C inkubiert. Als Kontrolle wurde der scFv mit Medium (0) inkubiert. Anschließend wurden die Proben in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Ein Fehlen der Bande bei 30 kD weist auf eine Proteaseaktivität hin. Die Western Blot-Membranen wurden grafisch mit der Software ImageJ ausgewertet und die relative Signalstärke (C) bezogen auf den Standard sowie die spezifische Signalstärke (D) mit Bezug auf die Biomasse berechnet.

Durch die Verwendung des Komplexmediums wurden hohe Proteinmengen in das Medium abgegeben, sodass es keiner Fällung bedurfte, um die Nachweisgrenze bei der Coomassie-Färbung zu übersteigen (Abb. 3.37 A, B). Ein Vergleich der Bahnen beim Fed-Batch-Ansatz nach 25 h und 40 h zeigt, dass durch das Verfahren die Menge an nativer Glucoamylase (ca. 70 kD) massiv gesteigert werden kann. Sowohl beim Batch- als auch beim Fed-Batch-Verfahren konnte das heterologe Fusionsprotein mittels *his-tag* detektiert werden. Das Signal ist spezifisch, da beim vergleichbaren Stamm mit *myc-tag* kein Signal erhalten wurde. Bei beiden Verfahren wurden kaum Abbauprodukte detektiert, lediglich bei 55 kD war ein schwaches Signal im Fed-Batch-Ansatz zu erkennen. In den Batch-Phasen beider Verfahren waren die Mengen an produziertem Protein vergleichbar hoch. In der Feeding-Phase stieg die Menge an Fusionsprotein um ca. 25 %, blieb jedoch danach auf einem konstanten Niveau. Nach der langen Feeding-Phase nach 40 h hat sich das Signal abgeschwächt, es konnte weniger Protein nachgewiesen werden als nach 25 h. Der Grund hierfür lag in der Proteaseaktivität, welche im Überstand detektiert werden konnte. Während im Batch-Verfahren und im Fed-Batch-Verfahren bis 25 h keine Proteaseaktivität detektiert werden konnte, so konnte nach 40 h eine starke Aktivität nachgewiesen werden. Diese führte dazu, dass produziertes Fusionsprotein zum Teil wieder abgebaut wurde. Die spezifische Signalstärke zeigt, dass bei beiden Verfahren die spezifische Produktmenge mit der Zeit anstieg und bis zum Schluss der Kultivierung nicht abfiel.

Die Kultur im Batch-Verfahren wurde nach 21 h geerntet, die Kultur im Fed-Batch-Verfahren nach 40 h. Die Kulturüberstände beider Verfahren sollten im Anschluss für eine Proteinisolation mittels Affinitätschromatographie eingesetzt werden (Abb. 3.38). Dazu wurde ein Verfahren mit gepacktem Säulenmaterial durchgeführt. Die Aufreinigung wurde mittels HPLC gesteuert, sodass die Qualität des eluierten Materials durch Absorption von UV-Licht bei 280 nm überprüft werden konnte. Der Ablauf dieses Aufreinigungsverfahrens besaß den gleichen Grundaufbau wie die Aufreinigung mit losem Säulenmaterial. Zusätzliche Schritte waren die Zentrifugation und Filtration des Kulturüberstandes nach der Dialyse der gefällten Proteine, damit es zu keiner Verstopfung der Chromatographie-Säule kam. Das dabei entstandene Pellet wurde ebenfalls auf Vorhandensein des Produktes untersucht. Nach der Bindung der Fusionsproteine an die Säule wurde einmalig mit Bindepuffer gewaschen (mit 10 mM Imidazol). Dabei wurden Fraktionen der Säulenvolumina 2 und 3 aufgefangen (Waschfraktion 1) sowie Säulenvolumina 9 und 10 (Waschfraktion 2). Die Elution wurde ebenfalls fraktioniert, indem die ersten 14 ml und das darauffolgende Volumen getrennt wurden (Elutionsfraktion 1 und 2). Leider konnte nur ein Aufreinigungsdurchgang pro Tag

durchgeführt werden, da dieses Verfahren sehr zeitaufwändig ist. Daher wurde der Kulturüberstand des Batch-Verfahrens sofort für die Aufreinigung eingesetzt, der Überstand des Fed-Batch-Verfahrens wurde für ca. eine Woche bei -80 °C gelagert, nachdem eine erste Filtration (Entfernung des Myzels) sowie eine Zentrifugation erfolgt war um eventuelle Zellreste zu entfernen. In einem Versuch wurde vorher gezeigt, dass sich das Einfrieren und Auftauen nicht auf die Qualität des Aufreinigungsprozesses auswirkt (Daten nicht gezeigt). Beide Aufreinigungsergebnisse können daher verglichen werden.

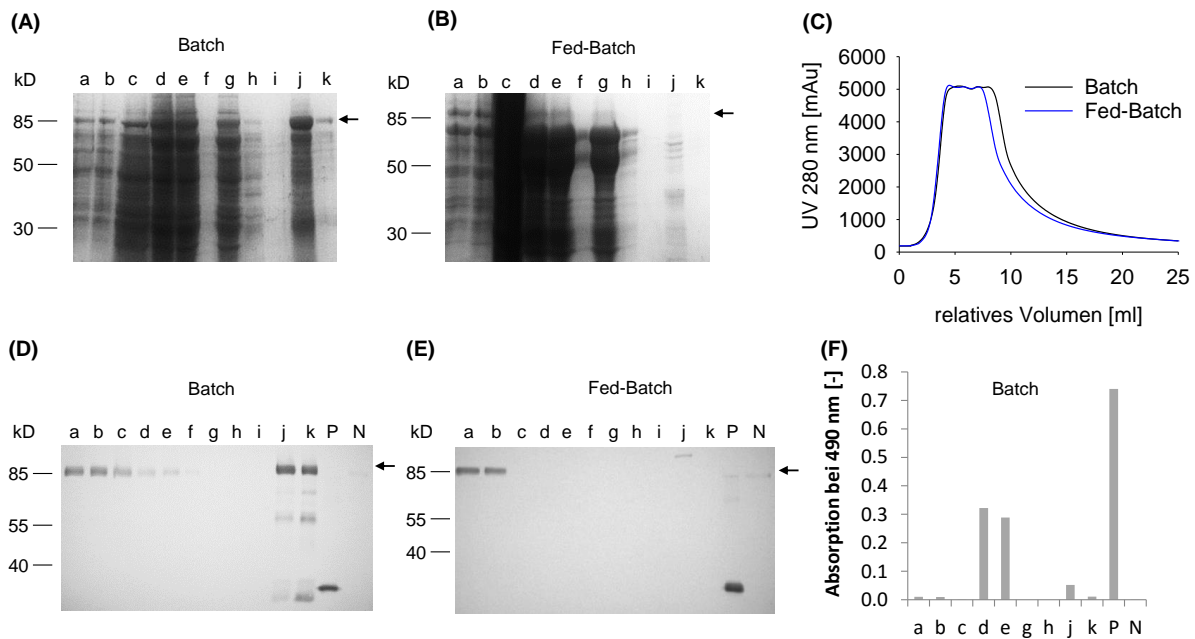


Abb. 3.38: Aus dem Kulturüberstand des Fed-Batch-Verfahrens konnte keinerlei Fusionsprotein isoliert werden. Die Fusionsproteine wurden mittels HPLC-gesteuerter Affinitätschromatographie über den *his-tag* aus den Kulturüberständen isoliert. Die während der Aufreinigung entstandenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und über Coomassie-Färbung analysiert: **(A)** Batch-Verfahren, **(B)** Fed-Batch-Verfahren. Die Chromatogramme der Elutionen wurden miteinander verglichen **(C)**. Für eine Verlust-Analyse wurden die Proteinkonzentrationen angepasst und in einem Western Blot der *his-tag* der Fusionsproteine detektiert: **(D)** Batch-Verfahren, **(E)** Fed-Batch-Verfahren. Die Entwicklung des Western Blots erfolgte mittels Anfärbung der Membran mit NBT/BCIP-System. Die Fraktionen der Kultivierung des Batch-Verfahrens wurden mit gleichen Volumina in einem ELISA auf Antigenbindung untersucht **(F)**. Es wurden folgende Fraktionen erzeugt: **(a)** Überstand, **(b)** Überstand nach Zentrifugation, **(c)** gefällte, konzentrierte Proteine, **(d)** gefällte Proteine nach Dialyse, **(e)** anschließende Filtration und Zentrifugation, **(f)** pelletierte Proteine, **(g)** Durchlauf, **(h)** Waschfraktion 1, **(i)** Waschfraktion 2, **(j)** Elutionsfraktion 1 und **(k)** Elutionsfraktion 2. Die Pfeile zeigen die berechnete Laufhöhe des Fusionsproteins an. Als Positivkontrolle **(P)** wurde HT186-D11 (10 µg/ml, produziert in *E. coli*) verwendet, die Negativkontrolle **(N)** war die Elutionsfraktion des Stammes DHN-281, welcher unter gleichen Bedingungen ein Fusionsprotein mit *myc-tag* produziert.

Die Analyse mittels SDS-PAGE zeigt eindeutig, dass im Batch-Verfahren das Fusionsprotein isoliert werden konnte (Abb. 3.38 A), im Fed-Batch-Verfahren (B) hingegen wurde kein Fusionsprotein aufgereinigt. Ein Vergleich der Proteinbanden zeigt, dass selbst beim erfolgreichen Batch-Verfahren kein Unterschied zwischen den Bahnen vor (e) und nach (g) der Proteinisolation zu erkennen ist. Das Fusionsprotein konnte daher nicht eindeutig auf

Polyacrylamidgelen nach Coomassie-Färbung identifiziert werden, da entweder die Konzentration zu gering war oder es zu einer Überlagerung mit anderen Proteinen gleichen Molekulargewichtes kam. Das verwendete Aufreinigungsverfahren bietet noch einen großen Spielraum für Optimierungen, da die Elutionsfraktion neben dem gesuchten Fusionsprotein (ca. 85 kD) auch zahlreiche andere Proteine enthält. Ein stringenteres Waschen der Säule vor der Elution würde die Reinheit des Produktes wesentlich erhöhen.

In der Aufreinigungsreihe der SDS-PAGE ist zu sehen, dass für eine bessere Analyse die Proteinkonzentrationen angepasst werden müssen, da zum Beispiel beim Fed-Batch nach der Ammoniumsulfatfällung (B, Bahn c) das Gel überladen war und einzelne Proteinbanden nicht zu erkennen sind. Dennoch ist zu sehen, dass die Menge an sekretierten Proteinen in den Kulturüberständen beim Fed-Batch um ein Vielfaches höher lag als beim Batch-Verfahren.

Trotz der unterschiedlichen Ergebnisse der Aufreinigung waren die Chromatogramme der Elutionen bei beiden Verfahren sehr ähnlich, jedoch blieb das Signal beim Überstand des Batch-Verfahrens länger beim Maximalwert von 5000 mAu.

In einem Western Blot wurde überprüft, ob das aufgereinigte Protein tatsächlich den *his-tag* enthielt und an welcher Stelle der Aufreinigung es zum Verlust des Fusionsproteins gekommen ist (D und E). Dazu wurde versucht, die Fraktionen auf ähnliche Proteinmengen anzupassen. Ein genauer Vergleich der Banden ist dadurch dennoch nicht möglich. Im Batch-Verfahren (D) zeigt sich, dass sich das Fusionsprotein von der ersten Fraktion (unbehandelter Kulturüberstand, Bahn a) bis zur Filtration und Zentrifugation vor Auftragung auf die Säule (Bahn e) nachweisen ließ. Das dabei erzeugte Pellet (Bahn f) wies nahezu kein Fusionsprotein auf. Auch in den Waschfraktionen (Bahn h und i) konnte kein Produkt nachgewiesen werden. Bei beiden Elutionsfraktionen (Bahn j und h) wurde das vollständige Fusionsprotein nachgewiesen, aber auch Abbauprodukte bei ca. 25 kD und 55 kD waren zu erkennen. Die Negativkontrolle zeigt, dass es zwar zu einer leichten Bande kam, diese hatte jedoch eine etwas geringere Laufhöhe (ca. 80 kD) als das Fusionsprotein (ca. 85 kD). Die Aufreinigung des Überstandes des Fed-Batch-Verfahrens (E) zeigt, dass nach der Ernte und der Zentrifugation des Überstandes das Fusionsprotein noch vorhanden war. Nach der Fällung konnte keinerlei Produkt mehr detektiert werden. Die Elutionsfraktion wies zwar eine Bande auf, diese besaß allerdings eine Laufhöhe von ca. 100 kD und stellt daher eine unspezifische Bindung des Antikörpers dar. Dieser Western Blot zeigt, dass es zum vollständigen Verlust des Produktes während der Fällung oder im Auftauprozess gekommen sein muss, welcher der Fällung vorausgegangen war, da der zentrifugierte Kulturüberstand für ca. eine Woche bei -80 °C

gelagert wurde. Dieser Überstand enthielt nachweislich Proteasen (Abb. 3.37 B), welche vor und während der Fällung das Produkt abbauen konnten.

Im ELISA (F) wurde nur der Überstand des Batch-Verfahrens untersucht. Dabei wurden gleiche Volumina der Proben verwendet, wodurch die Höhe der Signale untereinander nicht vergleichbar ist, da zum Beispiel vor und nach der Fällung der Proteine ein Konzentrationsunterschied von Faktor 30 eingeführt wurde. Es konnte aktives Fusionsprotein sowohl im nicht behandelten Kulturüberstand (a) als auch in den Proben vor der Proteinisolation (d, e) nachgewiesen werden. Der Durchlauf (g) enthielt keinerlei Fusionsprotein mehr, die Bindung des *his-tags* an das Säulenmaterial scheint daher sehr effektiv zu sein. Auch die Waschfraktionen (h) zeigten keine Aktivität auf. Die Elutionsfraktionen (j, k) hingegen zeigten beide MUC-1-bindende Aktivität auf. Der Vergleich der Proben nach der Fällung vor (c) und nach der Dialyse (d) deuten darauf hin, dass das Ammoniumsulfat, welches durch die Dialyse entfernt wurde, die Bindung des Fusionsprotein behinderte, obwohl das Protein nachweislich in der Probe enthalten war (gezeigt im Western Blot). Auch die Elutionsfraktion zeigte eine MUC-1-bindende Aktivität auf. Die Konzentrationsunterschiede zwischen den Proben waren im ELISA dieselben, wie auf den Polyacrylamidgelen der Aufreinigung (A, B), ein Vergleich ist daher möglich. Es fällt dabei auf, dass die Aktivität der Elutionsfraktion 1 wesentlich geringer war als der Fraktion der gefällten Proteine nach der Dialyse, obwohl die Elutionsfraktion nachweislich mehr Fusionsprotein enthielt. Die Höhe des Signals im ELISA scheint daher von anderen Einflüssen abhängig zu sein.

Mit Hilfe der Daten des Western Blots kann versucht werden abzuschätzen, in welchem Schritt es Verluste des Produktes bei der Proteinisolation gibt. Dadurch kann ein Rückschluss auf die Qualität der Aufreinigung und der Gesamtmenge des Produktes im unbehandelten Kulturüberstand gezogen werden. Es wurden daher mittels der Software ImageJ die Signalstärken im Western Blot bestimmt und unter Berücksichtigung der bei der Aufreinigung angefallenen Volumina der Gesamtverlust berechnet. Dabei zeigte sich, dass lediglich 18 % der Gesamtmenge des Fusionsproteins erfolgreich isoliert werden konnten, der Verlust des Produktes betrug daher 82 %. Der größte Verlust wurde bei der Fällung der Proteine verzeichnet (75 %), in den anschließenden Schritten gingen lediglich weitere 7 % verloren. Bemerkenswert ist, dass in den Waschfraktionen keinerlei Produkt nachgewiesen wurde.

Mit der vergleichenden Proteinisolation wurde deutlich, dass zwar mit dem Fed-Batch-Verfahren eine höhere Produktmenge erreicht wurde, dieses jedoch im anschließenden

Aufreinigungsprozess nicht isoliert werden konnte und es zum vollständigen Verlust des Produktes aufgrund von Proteaseaktivität kam. Zusätzlich wurde der Produktabbau durch die Lagerung bei -80 °C mit anschließender mehrstündiger Auftauphase begünstigt, wodurch die Proteasen einen zusätzlichen Abbaue Zeitraum erhielten. Das Batch-Verfahren hingegen eignet sich für die erfolgreiche Produktion von heterologen Proteinen in *N. crassa*, da mit dem verwendeten Produktionsstamm keinerlei signifikante Proteaseaktivität vorlag und daher das vollständige Produkt hergestellt und isoliert werden konnte. Obwohl im Fed-Batch-Verfahren zwischenzeitlich eine Erhöhung der Produktkonzentration von bis 25 % erreicht wurde, führten die zu einem späteren Zeitpunkt freigesetzten Proteasen zum Abbau des Produktes. Dennoch sollte das Fed-Batch-Verfahren weiter untersucht werden, da die allgemeine Proteinkonzentration im Kulturüberstand um ein Vielfaches erhöht werden konnte.

3.6.3 Abschätzung der Menge an produziertem heterologen Fusionsprotein

In den vorangegangenen Abschnitten wurde gezeigt, dass mit *N. crassa* Antikörperfragmente als Fusionsprotein produziert und aus dem Kulturüberstand isoliert werden können. Die Fraktionen, welche das Produkt enthalten, zeigen eine MUC-1-bindende Aktivität auf, wodurch nachgewiesen ist, dass das Protein korrekt gefaltet ist. Eine zentrale Frage bei der Erzeugung eines neuartigen Expressionssystems ist die Höhe der Ausbeute des heterologen Produktes, da es dadurch mit anderen Systemen verglichen werden kann. Für die Klärung dieser Frage wurden drei verschiedene Ansätze durchgeführt, welche auf unterschiedlichen Prinzipien basieren. Im Western Blot und ELISA können die Fusionsproteine mit einem Standard verglichen werden. Sowohl das Fusionsprotein als auch der Standard (HT186-D11 produziert in *E. coli*) enthalten einen *his*-tag, jedoch ist dies beim Standard ein *his*₆-tag, das Fusionsprotein enthält einen *his*₁₀-tag. Der Hintergrund bei der Einführung des *his*₁₀-tags war die bessere Bindung an das Säulenmaterial und dadurch eine höhere Qualität der Aufreinigung. Sowohl im Western Blot als auch im ELISA können nun die Signale von Produkt und Standard verglichen werden, wobei der Einfluss der zusätzlichen Histidin-Reste nicht bekannt ist. Das Ergebnis soll daher lediglich eine Abschätzung darstellen. Im Western Blot wird die gesamte Proteinmenge bestimmt, da das Protein denaturiert auf der Membran gebunden vorliegt und daher eine fehlerhafte Faltung vor der Denaturierung irrelevant ist. Im ELISA hingegen wird nur das aktive Material detektiert, der scFv HT186-D11 muss das Antigen MUC-1 binden können. Die dritte hiervon unabhängige Methode basiert auf einer SDS-PAGE mit anschließender Anfärbung mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250. Hier wird eine

Verdünnungsreihe der Elutionsfraktion 1 des Batch-Verfahrens mit einer Verdünnungsreihe des Proteins BSA (bovines Serumalbumin) einer bekannten Menge verglichen (Abb. 3.39). Daraus ergeben sich unterschiedlich hohe Ausbeuten, welche in Tab. 3.9 dargestellt sind.

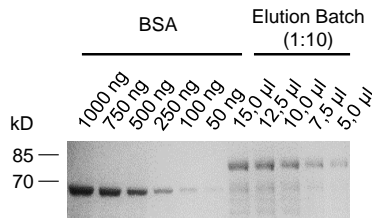


Abb. 3.39: Quantifizierung der Proteinmenge in der Elutionsfraktion. Für eine Quantifizierung wurde die Elutionsfraktion des Kulturüberstandes des Batch-Verfahrens in einer Verdünnungsreihe mit dem Standard BSA verglichen. Dazu wurden die Proteine in einer SDS-PAGE aufgetrennt und über Coomassie-Färbung analysiert.

Tab. 3.9: Vergleich der Ausbeuten des heterologen Fusionsproteins unter Verwendung unterschiedlicher Nachweismethoden. Bei allen Methoden wurde die Elutionsfraktion 1 des Batch-Verfahrens eingesetzt. Beim Western Blot und ELISA erfolgte der Vergleich mit HT186-D11-his₆, bei der SDS-PAGE mit BSA. Nachträglich wurde ein prognostizierter Verlust von 82 % einberechnet.

| Verfahren | Konz. in ÜS | korrig. Konz. in ÜS mit 82 % Verlusten |
|---------------|-------------|--|
| SDS-PAGE, BSA | 2,6 mg/L | 14,4 mg/L |
| Western Blot | 0,6 mg/L | 3,3 mg/L |
| ELISA | 0,6 µg/L | 3,3 µg/L |

Je nach verwendeter Methode schwankt die Produktkonzentration zwischen ca. 3 mg/L und 15 mg/L, wenn davon ausgegangen wird, dass bei der Aufreinigung tatsächlich ca. 80 % des Produktes verloren gehen. Im ELISA fallen die berechneten Konzentrationen um einen Faktor von 1000 geringer aus, wobei nur die aktiven Moleküle nachgewiesen werden. Es zeigt sich also eine Diskrepanz zwischen der Gesamtmenge und der aktiven Menge des Produktes. Zusätzlich muss beachtet werden, dass sowohl im ELISA als auch im Western Blot nicht bekannt ist, ob der *his₆-tag* zu gleichen Signalen führt wie der *his₁₀-tag*, wodurch sich die tatsächliche Ausbeute in beide Richtungen verändern könnte.

Diese Arbeit hat gezeigt, dass sich *N. crassa* zur heterologen Proteinproduktion eignet. Das Antikörperfragment HT186-D11, welches als Modell für heterologe Proteine diente, wurde in Form eines Fusionsproteins mit der gekürzten Glucoamylase GLA_t produziert und ins Kulturmedium sekretiert. Für eine erfolgreiche Produktion musste ein proteasedefizienter Stamm entwickelt und verschiedene Promotoren verglichen werden. In einem parallelen Bioreaktorsystem (1 L-Maßstab) wurde der Produktionsprozess optimiert. Anschließend konnte ein Scale-Up vom 1 L-Maßstab auf einen 10 L-Maßstab erfolgen. In einem einmalig durchgeführten Fed-Batch-Verfahren wurde demonstriert, dass auch mit einem filamentösen Pilz diese Art der Prozessführung möglich ist. Für die Produktion des Fusionsproteins GLA_t-HT186-D11 ist dieses Verfahren in der durchgeführten Form jedoch ungeeignet, da der

Pilz in der späten Feedingphase Proteasen freisetzt, die während der Aufarbeitung des Produktes zum vollständigen Abbau führen. Bei einem Batch-Verfahren konnte das Fusionsprotein erfolgreich isoliert werden, die Aktivität des Proteins fiel jedoch geringer als erwartet aus, denn nur ca. 1 % der Fusionsproteine ist aktiv. Die Qualität der Aufarbeitung wurde exemplarisch überprüft und festgestellt, dass es während des Prozesses zu einem Verlust von ca. 80 % des Produktes kommt. Trotz der erfolgreichen Produktion kann sowohl der Stamm als auch der Prozess weiter optimiert werden, damit *N. crassa* in Zukunft eine Alternative zu etablierten Produktionssystem darstellen kann.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der filamentöse Pilz *Neurospora crassa* zu einem Produktionswirt für Antikörperfragmente umgewandelt. Dabei wurde ein System entwickelt, bei welchem das Produkt als Fusionsprotein mit einem endogenen Enzym in den Kulturüberstand sekretiert wird. Es wurden verschiedene Produktionsstämme erzeugt, welche unter anderem Kombinationen zahlreicher Deletionen oder Mutationen besaßen und die Expressionskassette unterschiedliche Promotoren enthielt. Nach der erfolgreichen Produktion im Schüttelkolbenmaßstab wurde ein paralleles Bioreaktorsystem für eine Prozess- und Medienoptimierung genutzt. Kritische Punkte bei der Etablierung dieses Expressionssystems waren die Beseitigung von Proteaseaktivität im Kulturüberstand, welche zum Abbau des Antikörperfragmentes führt, sowie die erfolgreiche Sekretion des Produktes.

4.1 Abbau heterologer Proteine durch Proteasen

Durch ihre saprophytische Lebensweise haben filamentöse Pilze die Eigenschaft, Proteasen in ihre Umgebung abzugeben (Hu & St. Leger, 2004). Dadurch werden Proteine abgebaut und die freigesetzten Aminosäuren können als Substrat aufgenommen werden. Diese Eigenschaft ist die größte Herausforderung bei der Nutzung eines filamentösen Pilzes als Produktionswirt für heterologe Proteine. Wird die Sekretion dieser Proteasen nicht unterbunden, wird das Produkt unter Umständen sofort wieder abgebaut. Daher müssen Strategien entwickelt werden, um entweder proteasedefiziente Stämme zu erzeugen oder durch prozesstechnische Maßnahmen die Sekretion bzw. die Aktivität der Proteasen zu verhindern.

In dieser Arbeit wurden zwei gentechnische Strategien für die Erzeugung von proteasedefizienten Stämmen verglichen. Die erste Strategie war die Deletion des *vib-1*-Gens, welches einen Transkriptionsfaktor kodiert, der unter anderem die Sekretion von extrazellulären Proteasen reguliert (Dementhon *et al.*, 2006). Bei der zweiten Strategie wurden Deletionen einzelner Proteasegene in einem Stamm kombiniert.

Um die Ursache für extrazelluläre Proteaseaktivität bei *N. crassa* zu identifizieren, ist das Verständnis der Regulation der Proteasen notwendig. In *N. crassa* wurden bereits in den 1970er und 1980er Jahren zahlreiche Proteasen über klassische Methoden analysiert. Dabei wurde schon früh festgestellt, dass die Sekretion extrazellulärer Proteasen über Katabolitderepression und Induktion durch eine externe Proteinquelle hervorgerufen werden kann (Drucker, 1972). Aufgrund ihrer diversen Zusammensetzung können Proteine für Pilze als Quellen für Kohlenstoff, Stickstoff und Schwefel dienen. Es wurde gezeigt, dass unter den genannten

Bedingungen die Proteasen *de novo* synthetisiert und sekretiert werden (Abbott & Marzluf, 1984). Dies kann unter limitierenden Bedingungen bereits eine Stunde nach Beginn der exponentiellen Wachstumsphase beginnen. Durch höhere Zucker-, aber auch Aminosäurekonzentrationen im Medium, kann die Proteasesekretion verhindert werden (Drucker, 1972). In den darauffolgenden Jahren wurden verschiedene Proteasen, welche unter unterschiedlichen Limitierungen sekretiert werden, untersucht. Eine dieser Proteasen wird bei Schwefelmangel sekretiert und die Expression kann durch Zugabe von Sulfat oder Methionin reprimiert werden (Hanson & Marzluf, 1973). Es wurden neutrale (Cohen *et al.*, 1975), alkalische (Lindberg *et al.*, 1981) und saure Proteasen (Lindberg *et al.*, 1982; Rhodes *et al.*, 1983) untersucht. Die pH-Optima unterscheiden sich erheblich, sodass es unter üblichen Kultivierungsbedingungen keinen pH-Wert gibt, bei welchem alle Proteasen inaktiv sind. Für einzelne Proteasen kann eine Veränderung des pH-Wertes jedoch zu einem großen Unterschied bei der Aktivität führen, wie z. B. bei der Protease APR-1, bei welcher eine Erhöhung von pH 4,5 auf pH 6,5 zu einer Verringerung um 94 % der Proteaseaktivität führt. Ein Herabsenken der Temperatur von 30 °C auf 15 °C führt zu einer Verringerung der Aktivität um 70 % (Guo *et al.*, 2011). Auch über die Induktion durch Licht wurde berichtet (Kallies *et al.*, 1992).

Nach der erfolgreichen Sequenzierung und Annotation des *N. crassa*-Genoms (Galagan *et al.*, 2003) konnte über bioinformatische Methoden dieses auf hypothetische Proteasen untersucht werden. Borkovich *et al.* haben dabei 55 Proteasen vorhergesagt, wovon 12 als extrazellulär eingestuft worden sind (Borkovich *et al.*, 2004). Eine Zusammenfassung aller bis dahin bekannten Proteasen erfolgte 2006 in der Dissertation von Alves (Tab. 4.1), wobei versucht wurde, klassische und moderne Daten zu kombinieren (Alves, 2006). Es fällt jedoch auf, dass diese Auflistung nicht vollständig ist, da zahlreiche Beispiele fehlen (Cohen & Drucker, 1977; Cohen *et al.*, 1975; Drucker, 1972).

Tab. 4.1: Übersicht aller beschriebenen bzw. vorhergesagten Proteasen. Bearbeitet nach Alves (2006). Abkürzungen: N, Stickstoff; C, Kohlenstoff; S, Schwefel; k. A., keine Angabe

| N. crassa-Locus | N. crassa-Genname | Definition | Induktion durch Mangel an | Referenz |
|-----------------|-------------------|---------------------------------|---------------------------|---|
| NCU00249 | - | saure Protease | k. A. | Borkovich <i>et al.</i> , 2004 |
| NCU00263 | - | Serin-Protease | k. A. | Borkovich <i>et al.</i> , 2004 |
| NCU00338 | apr-1 | saure Protease | Licht | Kallies <i>et al.</i> , 1992 Borkovich <i>et al.</i> , 2004 |
| NCU00994 | apr-2 | saure Protease | k. A. | Borkovich <i>et al.</i> , 2004 |
| NCU02059 | apr-3 | saure Protease | k. A. | Borkovich <i>et al.</i> , 2004 |
| NCU02956 | apr-4 | saure Protease | k. A. | Borkovich <i>et al.</i> , 2004 |
| NCU03168 | apr-5 | saure Protease | k. A. | Borkovich <i>et al.</i> , 2004 |
| NCU05071 | mpr-3 | Protease M1 (Metalloprotease) | N; C | Lindberg <i>et al.</i> , 1982 |
| NCU05756 | - | Peptidase M4 (Metallopeptidase) | k. A. | Borkovich <i>et al.</i> , 2004 |
| NCU05908 | mpr-4 | Protease M2 (Metalloprotease) | N; S | Lindberg <i>et al.</i> , 1982 |
| NCU06720 | - | Serin-Carboxypeptidase | Licht | Kallies <i>et al.</i> , 1992 |
| NCU06949 | spr-6 | alkalische Protease | S | Lindberg <i>et al.</i> , 1981 |
| NCU07063 | apr-8 | saure Protease | k. A. | Borkovich <i>et al.</i> , 2004 |
| NCU07533 | apr-9 | alkalische Protease | S | Lindberg <i>et al.</i> , 1982 Borkovich <i>et al.</i> , 2004 |
| NCU08739 | apr-10 | saure Protease | S | Rhodes <i>et al.</i> , 1983 |
| NCU09155 | apr-11 | saure Protease | k. A. | Borkovich <i>et al.</i> , 2004 |
| NCU09484 | apr-12 | saure Protease | k. A. | Borkovich <i>et al.</i> , 2004 |

Bei einem Vergleich der Proteasen aus Tab. 4.1 und den in dieser Arbeit identifizierten Proteasen (Tab. 3.6) stellt sich heraus, dass die Proteasen APR-3, APR-9 und NCU00263 in beiden Listen auftauchen. APR-3 und NCU00263 wurden lediglich vorhergesagt (Borkovich *et al.*, 2004), bei APR-9 handelt es sich um eine saure Protease, welche biochemisch charakterisiert ist (Lindberg *et al.*, 1982). Die Protease mit der damaligen Bezeichnung AcP besitzt ein Molekulargewicht von 66 kD, ist stabil bei pH-Werten zwischen 3,0 und 6,0 mit einem Optimum für BSA-Abbau bei pH 4,0 und wird nur bei Schwefelmangel sekretiert (Lindberg *et al.*, 1982). Die meisten der in Tab. 4.1 gelisteten Proteasen wurden ebenfalls untersucht. Die Gene *NCU00249*, *NCU02956* und *NCU09155* wurden zwar über die Datenbanksuche für eine Überprüfung ausgewählt, konnten jedoch nicht untersucht werden, da die Knock-out-Bibliothek diese Deletionsmutanten nicht enthielt. Nicht in Betracht gezogen wurden alle Metalloproteasen sowie die alkalische Protease SPR-6. Drei der vier Proteasen wurden biochemisch charakterisiert und werden bei Nährstofflimitierungen sekretiert. Für eine weitere Optimierung des verwendeten Produktionsstammes könnten daher diese Gene zusätzlich ausgeschaltet werden.

Die für diese Arbeit wichtigste Protease war jedoch SPR-7, da sie zur höchsten Verringerung der Proteaseaktivität in Bezug auf Abbau des scFv HT186-D11 geführt hat. SPR-7 wird in der

Literatur bislang nicht in diesem Zusammenhang erwähnt und ist daher auch nicht biochemisch charakterisiert. Es handelt sich um eine Subtilisin-ähnliche Serinprotease und führt bei Deletion in Keimlingen zu einer erhöhten Fusionsrate (Palma-Guerrero *et al.*, 2013). Es wird vermutet, dass es sich bei dieser Protease um einen negativen Regulator im Signalweg der Selbsterkennung handelt (Lichius & Lord, 2014).

Sowohl die Deletion des *vib-1*-Gens als auch die Deletion von vier Proteasegenen hat zum Ziel geführt, heterologe Proteine mit *N. crassa* herzustellen. Für das Erreichen dieses Zieles war jedoch eine Medienoptimierung notwendig, welche mit einem Δ *vib-1*-Produktionsstamm (DHN-201) durchgeführt wurde. Bereits im Schüttelkolbenmaßstab wurde festgestellt, dass bei Verwendung höherer Anfangszuckerkonzentrationen Proteasen in das Kulturmedium am Ende der Kultivierung freigesetzt werden, welche eine HT186-D11-abbauende Aktivität aufweisen. Zunächst wurde vermutet, dass eine C-Quellen-Limitierung am Ende der exponentiellen Wachstumsphase zur Zellyse führte (White *et al.*, 2002) und intrazelluläre Proteasen freigesetzt wurden. Ein ähnlicher Vorgang konnte bei Kultivierung des Pilzes *Penicillium chrysogenum* beobachtet werden (McNeil *et al.*, 1998).

Dementhon *et al.* hatten darüber berichtet, dass die *vib-1*-Deletionsmutante eine stark reduzierte Proteaseaktivität bei Limitierung der Stickstoff- oder Kohlenstoffquelle im Vergleich zum Wildtyp aufweist (Dementhon *et al.*, 2006). Bereits bei den ersten Kultivierungen im parallelen Laborbioreaktorsystem fiel jedoch auf, dass es einen grundlegenden Unterschied bei der Analysemethode zur Bestimmung der Proteaseaktivität gab. Während mit der auf dem Abbau von Casein basierende Methode von Dementhon *et al.* keine Proteaseaktivität messbar war, wurde bei der in dieser Arbeit entwickelten Methode (basierend auf dem Abbau des späteren Produktes) eine eindeutige Proteaseaktivität nach ca. 18 h festgestellt (siehe Anhang, Abb. 6.1). Daher wurde davon ausgegangen, dass mit der Casein-Methode nicht jene Proteasen detektiert werden können, welche zum Abbau von HT186-D11 führen. Bei der darauffolgenden Prozessoptimierung wurde versucht, die Sekretion von HT186-D11-abbauenden Proteasen durch abgeänderte Kultivierungsbedingungen zu unterbinden. Das Hauptaugenmerk wurde auf die Zusammensetzung und den pH-Wert des Mediums gelegt.

Bei der Medienoptimierung wurde zunächst vermutet, dass Stickstoffmangel für die Sekretion extrazellulärer Proteasen verantwortlich ist. Bereits zuvor wurde nachgewiesen, dass Proteasen noch bei höheren Zuckerkonzentrationen in das Medium gelangen, eine C-Quellen-Limitierung konnte also ausgeschlossen werden. Tatsächlich werden laut Tab. 4.1 sowie in den

oben erwähnten Publikationen unter diesen Stickstoff-limitierenden Bedingungen zahlreiche Proteasen sekretiert (Abbott & Marzluf, 1984; Cohen & Drucker, 1977; Cohen *et al.*, 1975; Lindberg *et al.*, 1982). Da eine Erhöhung der Ammoniumkonzentration zu keiner Verringerung der Proteaseaktivität geführt hat, wird vermutet, dass die Proteasen, welche spezifisch für HT186-D11 sind, nicht aufgrund von Stickstoffmangel sekretiert werden. Da nachgewiesen wurde, dass auch Kohlenstoff in ausreichender Konzentration bei Einsetzen der Proteaseaktivität vorhanden war, scheint Schwefelmangel ein möglicher Grund für die Proteaseaktivität zu sein. Hierbei fällt auf, dass insbesondere APR-9 bei Schwefelmangel sekretiert wird (Lindberg *et al.*, 1982). Die Deletion dieses Proteasegens erwies sich daher auch rückwirkend als sinnvoll.

Während der Medienoptimierung wurde im Bird Medium die Ammoniumkonzentration auf 65 mM erhöht, indem 32,5 mM Ammoniumsulfat verwendet wurden. Dadurch wurde die Ammoniumkonzentration um Faktor 2,6 und zeitgleich die Sulfatkonzentration um Faktor 40 erhöht. Obwohl die Auswechslung von Ammoniumchlorid zu Ammoniumsulfat in erster Linie technische Gründe hatte (erhöhte Korrosion von Edelstahl), kann dadurch nun ausgeschlossen werden, dass bei Kultivierung in diesem Medium ein Schwefelmangel auftritt. Eine Sekretion von Proteasen, welche nur durch eine einfache Limitierung durch Kohlenstoff, Stickstoff oder Schwefel verursacht wird, kann daher ausgeschlossen werden.

Die nächste Maßnahme für die Reduzierung der Proteaseaktivität sollte durch eine Veränderung des pH-Wertes des Mediums erreicht werden. Zunächst wurde gezeigt, dass die Freisetzung der Proteasen keine Stressantwort auf die pH-Wert-Regulation war und der Anstieg der spezifischen Proteaseaktivität nur zufällig zum gleichen Zeitpunkt einsetzte wie der Beginn der Zugabe der Lauge. Als optimaler pH-Wert wurde hierbei pH 6,5 ermittelt. Es ist dabei auszugehen, dass mehrere Proteasen am Abbau von HT186-D11 beteiligt sind und die pH-Optima dieser Proteasen unterschiedlich sind. Es ist daher wahrscheinlich, dass eher saure Proteasen den Hauptanteil der Proteaseaktivität stellen und nur ein geringer Anteil aus neutralen und alkalischen Proteasen besteht. Ähnliche Ergebnisse wurden bei *A. niger* erzielt, bei welchem durch die Erhöhung des pH-Wertes von 3 auf 6 die Ausbeute eines Carrier-Fusionsproteins (GLA-GFP) um den Faktor 10 erhöht wurde. Als Grund wurde eine verringerte Aktivität bereits sekretierter Proteasen festgestellt und ein geändertes Spektrum sekretierter Proteasen vermutet (O'Donnell *et al.*, 2001), was unter anderem durch pH-Wert-abhängige Genexpression begründet werden könnte (Denison, 2000). Auch bei *T. reesei* konnte durch die Erhöhung von pH 6 auf pH 7 die Proteaseaktivität gesenkt werden (Zhang *et al.*, 2014).

Der Vergleich der Kultivierung in optimierten Bird Medium und Komplexmedium hat beim $\Delta vib-1$ -Produktionsstamm (DHN-252) eindeutig gezeigt, dass die Verwendung von komplexen Medienbestandteilen eine Proteaseaktivität unterbinden kann. Es gilt nun zu erörtern, welche Rolle diese komplexen Bestandteile im Medium spielen. Das optimierte Bird Medium enthält sämtliche zentralen Bestandteile wie Zucker, Ammonium und Sulfat im Überschuss. Eine einfache Limitierung ist daher nicht der Grund für die Proteaseaktivität. Zu den komplexen Medienbestandteilen zählen unter anderem auch Aminosäuren und Peptide. Offensichtlich benötigen $\Delta vib-1$ -Stämme diese Zusätze. Eine detaillierte Betrachtung der Rolle von VIB-1 ist daher notwendig. VIB-1 (*vegetative incompatibility blocked*) ist ein Transkriptionsfaktor, welcher sich in vegetativen Hyphen im Nukleus befindet und während der Reaktion auf vegetativer Inkompatibilität eine Rolle spielt (Dementhon *et al.*, 2006). Dieser Prozess dient bei *N. crassa* dazu, dass fusionierte Hyphen, die auf Stämmen mit unterschiedlichem *het*-Locus basieren, an der Fusionsstelle absterben. Der Grund für die vegetative Inkompatibilität ist wahrscheinlich die Vermeidung des Eindringens von virus-ähnlicher doppelsträngiger RNA oder die Ausnutzung durch aggressive Genotypen (Glass & Kaneko, 2003). Zusätzlich scheint VIB-1 eine Rolle bei der Regulation der Kohlenstoff-Katabolitrepression (*carbon catabolite repression*, CCR) und der Erkennung von Glucose zu spielen (Xiong *et al.*, 2014). Laut diesem Modell reprimiert VIB-1 unter Kohlenstoffmangel die CCR, welche wiederum z. B. die Expression von Cellulasegenen reprimiert. Gleichzeitig wird der Faktor COL26 reprimiert, welcher für den Glucosesignalweg verantwortlich ist. Inwiefern jedoch VIB-1 an der Regulation der Proteasen beteiligt ist, wird jedoch nicht beschrieben.

Der in $\Delta vib-1$ -Stämmen gestörte Glucosesignalweg könnte eine wichtige Rolle bei der Sekretion extrazellulärer Proteasen bei der Kultivierung in Bioreaktoren spielen. Auffällig ist, dass die Proteaseaktivität bereits dann messbar ist, wenn noch eine ausreichende Zuckermenge im Medium zur Verfügung steht. Denkbar wäre jedoch, dass aufgrund des gestörten Signalweges der Pilz das Signal eines Glucosemangels erhält. In diesem Fall exprimiert der Pilz Gene, welche für die Verwertung alternativer Kohlenstoffquellen, wie z. B. Proteinen, benötigt werden, obwohl keine Mangelsituation vorhanden ist. Die komplexen Bestandteile können in diesem Fall zwei Funktionen erfüllen. Bestimmte Aminosäuren könnten durch ihre Aufnahme zur Repression der Genexpression der Proteasegene führen. So unterbinden zum Beispiel Tryptophan, Histidin und Phenylalanin die Genexpression von Proteasen für die Verwertung von Proteinen als C-Quelle (Cohen & Drucker, 1977). Die zweite Funktion könnten Peptide erfüllen, welche ebenfalls im Komplexmedium vorhanden sind, indem sie

bereits sekretierten Proteasen als Substrat dienen könnten und daher eine Art Schutzfunktion für das heterologe Produkt erfüllen.

Eine weitere Möglichkeit der erhöhten Proteaseaktivität in $\Delta vib-1$ -Kulturen in Bioreaktoren könnte eine erhöhte Lyserate sein, wodurch intrazelluläre Proteasen vermehrt freigesetzt werden könnten (Ward, 2012). Dem entgegen steht jedoch die Tatsache, dass VIB-1 am Zelltod-Mechanismus beteiligt ist. Eine Deletion des Genes sollte folglich zu einer verringerten Lyserate durch diesen Mechanismus führen. Eine Überexpression von VIB-1 führt hingegen zur erhöhten Freisetzung intrazellulärer Proteine (Xiong *et al.*, 2014). Dennoch ist eine erhöhte Zellyserate im Bioreaktor nicht auszuschließen und müsste untersucht werden.

Ein Vergleich von Produktionsstämmen mit *vib-1*-Deletion und Stämmen mit Deletionen von *spr-7*, *apr-9*, *apr-3* und *NCU00263* zeigte eindeutig, dass im Gegensatz zum $\Delta vib-1$ -Produktionsstamm die Kombination einzelner Gene zur Beseitigung der Proteaseaktivität in der exponentiellen Wachstumsphase geführt hat. Zwar sind noch vereinzelt Abbauprodukte des Fusionsproteins nachgewiesen worden, das Produkt akkumulierte jedoch im Kulturüberstand und konnte sogar isoliert werden. Der Einsatz von Komplexmedium beseitigt auch diese Reste der Proteaseaktivität. Diese Ergebnisse zeigen, dass das optimierte Minimalmedium weiter verbessert werden könnte, zum Beispiel durch die Zugabe ausgewählter Aminosäuren, welche die Sekretion einiger Proteasen verhindern (Cohen & Drucker, 1977). Ausgehend von dieser Arbeit wird davon abgeraten, $\Delta vib-1$ -Produktionsstämme zu verwenden. Neben der weiterhin nicht gelösten Proteaseproblematik kommt es vereinzelt zu Kultivierungen, bei denen das Wachstum kurzfristig anhält (Abb. 3.31 sowie nicht gezeigte Daten). Diese mangelnde Robustheit des Stammes bei Kultivierungen im Bioreaktor führen zu unverlässlichen Kultivierungsverläufen. Der Stamm mit Deletionen einzelner Proteasegene lässt sich ebenfalls weiter optimieren, indem Deletionen zusätzlicher Proteasegene hinzugefügt werden. Aufgrund der großen Anzahl von Proteasen im *N. crassa*-Genom ist davon auszugehen, dass noch weitere sekretierte Proteasen eine HT186-D11-abbauende Aktivität aufweisen, welche bislang nicht identifiziert wurden (Borkovich *et al.*, 2004). Ein Produktionsstamm mit z. B. 10 Proteasedeletionen ist denkbar und wurde bei *A. oryzae* erfolgreich generiert, wodurch die Ausbeute eines heterologen Proteins im Vergleich zu einer Fünffachmutante deutlich gesteigert werden konnte (Yoon *et al.*, 2011).

4.2 Aufbau des Expressionssystems

4.2.1 Sekretion des Fusionsproteins in den Kulturüberstand

Für die Sekretion des heterologen Proteins wurde die Fusion mit einem stark sekretierten endogenen Protein, hier der Glucoamylase, gewählt. Glucoamylasen kommen in nahezu allen filamentösen Pilzen vor und befähigen Pilze zum Wachstum auf Stärke, indem sie einzelne Glucosemoleküle der nicht-reduzierenden Enden von Stärke und anderen Polysacchariden abspalten (Sauer *et al.*, 2000). Glucoamylasen bestehen aus einer katalytischen Domäne und einer stärkebindenden Domäne, welche durch einen flexiblen O-glykosylierten Linker verbunden sind. Die Molekülgröße bewegt sich abhängig vom Organismus zwischen 48 und 90 kD (Norouzian *et al.*, 2006). Die Sekretion von Glucoamylase wurde bei *A. niger* über die Fusion mit GFP untersucht. Dabei zeigte sich, dass das Fusionsprotein hauptsächlich an den Spitzen wachsender Hyphen sekretiert wird. Das Protein wurde in der gesamten Zellwand sowie in Septen lokalisiert. Zusätzlich zur Sekretion an der Hyphenspitze wurde auch eine subapicale Sekretion vermutet (Gordon *et al.*, 2000a, b; Khalaj *et al.*, 2001). Aufgrund ihrer hohen Konzentration in Kulturüberständen wurde die Glucoamylase daher in zahlreichen Expressionssystemen als Carrier für heterologe Proteine eingesetzt. Dabei wurde entweder das gesamte Protein (Broekhuijsen *et al.*, 1993) oder eine Variante mit Deletion der stärkebindenden Domäne eingesetzt (Gouka *et al.*, 1997; Jeenes *et al.*, 1993; Spencer & Jeenes, 1998).

Die *N. crassa*-Glucoamylase (GLA-1) ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 69 kD. Bei Wachstum auf Stärke oder Maltose sekretiert *N. crassa* GLA-1 mit einem Anteil von 17 % an allen sekretierten Proteinen (Koh-Luar *et al.*, 1989). Das Protein, dessen kodierendes Gen ein Intron mit 62 bp enthält, wird zunächst als ein Präpropeptid translatiert. Das Leaderpeptid aus 35 Aminosäuren enthält sowohl die Signalsequenz für die Sekretion als auch einen Pro-Abschnitt, welcher wahrscheinlich bei der Faltung hilft und während der posttranslationalen Modifikation entfernt wird. Die Signalsequenz besteht aus den typischen n-, h- und c-Regionen (siehe Abschnitt 1.4.3) und ist daher größtenteils hydrophob (Stone *et al.*, 1993).

Für die Charakterisierung von GLA-1 aus *N. crassa* wurde die Mutante *exo-1* verwendet, welche GLA-1 unter kohlenstofflimitierenden Bedingungen in 10-12fach höheren Mengen sekretiert als der Wildtyp (Gratzner & Sheehan, 1969). GLA-1 aus *exo-1* unterscheidet sich lediglich in ihrem isoelektrischen Punkt, alle anderen Eigenschaften sind identisch zur wildtypischen GLA-1 (Gratzner, 1972). Das Enzym aus *exo-1* enthält einen Zuckeranteil von

5.1 % und hat ein pH-Optimum bei pH 5,0 für die Spaltung von Maltose (Spinelli, 1996). 75 % aller GLA-1-assoziierten Zucker sind Galactosamin (Gratzner, 1972).

Die größte Herausforderung dieser Arbeit war es, das Fusionsprotein in den Kulturüberstand zu sekretieren. Dabei wurde zunächst die vollständige Glucoamylase (GLA-1) als *Carrier* verwendet, erst später wurde die stärkebindende Domäne deletiert (GLA_i). Obwohl bereits früh das Fusionsprotein (GLA-1-HT186-D11) intrazellulär nachgewiesen wurde (Abb. 3.7), konnte das Produkt extrazellulär lange Zeit nicht detektiert werden. Es wurde vermutet, dass zum einen ebenfalls sekretierte Proteasen das Produkt abbauen. Zum anderen wurde eine Assoziation mit der Biomasse postuliert, wodurch das Protein zwar produziert und sekretiert wird, anschließend jedoch an die Zellwand bindet und daher nicht frei im Kulturüberstand nachgewiesen werden kann. Die Unterbindung der Sekretion von Proteasen sollte durch die Einführung der *vib-1*-Deletion erreicht werden. Dies führte nach Herabsenken der Kultivierungstemperatur zum erstmaligen Nachweis des Produktes im Kulturüberstand in einem Fall (Abb. 3.8). Da diese Kultivierungsbedingungen jedoch nicht immer zur erfolgreichen Sekretion des Fusionsproteins führten, wurde angenommen, dass die Zellwandassoziation das eigentliche Problem darstellte (Gordon *et al.*, 2000a; Norouzian *et al.*, 2006).

Es gibt mehrere Modelle zur Assoziation von GLA-1 mit der Zellwand. In *N. crassa* wurde die Bindung über Zuckerbestandteile der Glucoamylase diskutiert (Gratzner, 1972). Eine weitere theoretische Möglichkeit der Assoziation von GLA-1 mit der Zellwand könnte auf elektrostatischen Kräften basieren. Sowohl Chitin (Murray & Neville, 1998) als auch Galactosamin-enthaltende Polymere in der Zellwand sind positiv geladen (Schmit *et al.*, 1975). Negativ geladene Aminosäurereste des Enzyms könnten dadurch an die Polymere binden und somit das gesamte Protein mit der Zellwand assoziieren. Als dritte Möglichkeit wurde für *N. crassa* das Model des molekularen Siebes vorgeschlagen, welches besagt, dass nur Proteine bis zu einer gewissen Größe die Zellwand passieren können (Trevithick & Metzberg, 1966a, b). Die Diffusionszeit ist dabei abhängig von der Zellwanddicke und der Porengröße. Diese Theorie wurde für das Enzym Invertase diskutiert und es wurde vermutet, dass es sich bei der Assoziation mit der Zellwand um einen rein physikalischen Einschluss in die Zellwandmatrix handelt (Chang & Trevithick, 1972).

Die Assoziation der Glucoamylase bzw. des Fusionsproteins sollte durch die Einführung der *exo-1*-Mutation in die Produktionsstämme unterbunden und somit die Ausbeute erhöht werden. *exo-1*-Mutanten besitzen eine veränderte Zellwandzusammensetzung bezüglich des Verhältnisses der Zucker Galactosamin und Glucosamin. Die starke Sekretion des Proteins stellt sich allerdings erst ein, wenn die C-Quelle verbraucht ist. Das Enzym wird dabei *de novo*

synthetisiert (Gratzner, 1972). Dies konnte durch Transkriptomanalysen des Wildtyps bestätigt werden, die zeigten, dass *gla-1*-mRNA bei Glucoselimitierung verstärkt gebildet wird (Xie *et al.*, 2004). Es wurden zwei Theorien für die verstärkte Sekretion von GLA-1 in *exo-1* aufgestellt. Die erste Theorie besagt, dass aufgrund der veränderten Zellwandzusammensetzung GLA-1 nicht mehr über seine Zuckerbestandteile an die Zellwand binden kann und daher verstärkt in das Kulturmedium gelangt (Gratzner, 1972). Die andere Theorie sagt aus, dass in *exo-1* die Regulation der Glucoamylase gestört ist, sodass es bei Katabolitderepression zur erhöhten Bildung von GLA-1 kommt. Dies wird dadurch belegt, dass sowohl extra- als auch intrazellulär die GLA-1-Konzentration unter C-Quellen-Limitierung ansteigt (Gratzner & Sheehan, 1969). Auch andere Enzyme wie Invertasen (Gratzner & Sheehan, 1969) und Pectinasen (Polizeli *et al.*, 1991; Spinelli, 1996) werden in *exo-1* verstärkt sekretiert.

Die Einführung der *exo-1*-Mutation führte jedoch nicht zum erfolgreichen Nachweis des Produktes im Überstand (Abb. 3.9). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass das veränderte Zuckerverhältnis in der Zellwand keinen Einfluss auf die Zellwandbindung von GLA-1 über seine Zuckerbestandteile hat. Nicht auszuschließen ist hingegen, dass sich die Porengröße der Zellwand verändert hat, wodurch das Diffusionsverhalten sekretierter Proteine abgewandelt ist. Unterstützt wird dies durch die Aussage, dass bei *exo-1*-Konidien GLA-1 durch Waschen entfernt werden kann (Gratzner, 1972). Dies wird dadurch bestätigt, dass in dieser Arbeit die GLA-1-Konzentration in Schüttelkolben mit Schikane höher war als in Kolben ohne Schikane. Durch die höheren Turbulenzen wird die Zellwand stärker beansprucht und darin gelagerte Bestandteile gelangen schneller in das Medium. Zusätzlich wurde bei *N. crassa* (Wildtyp) bei der Analyse von Proteinen, welche kovalent an die Zellwandmatrix gebunden sind, im Gegensatz zum Kulturüberstand keine GLA-1 nachgewiesen (Maddi *et al.*, 2009). Dies bekräftigt die Aussage, dass GLA-1 lediglich in der Zellwandmatrix eingeschlossen ist, diese jedoch über Diffusion verlassen kann. Die elektrostatische Zellwandbindung erscheint ebenfalls unwahrscheinlich. GLA-1 aus dem Wildtyp und aus *exo-1*-Stämmen unterschieden sich in ihrem isoelektrischen Punkt (IEP von 5,2 und 5,9). Die Ladung dieser GLA-1-Varianten ist bei gleichem Umgebungs-pH-Wert daher leicht verändert. Bei einem sauren pH-Wert von z. B. 4,5 müsste daher GLA-1 aus *exo-1* eine höhere positive Ladung als das Enzym aus dem Wildtyp tragen. Durch erhöhte Abstoßung könnte dies zu einer erhöhten Sekretion von GLA-1 führen. Es wird jedoch vermutet, dass der Unterschied im IEP zu gering ist, damit dieser Effekt ausschlaggebend sein könnte.

Die Rolle von *exo-1* in der Hypersekretion der Glucoamylase bleibt daher weiter zu erörtern. In dieser Arbeit konnte bereits zu Beginn die Hypersekretion nativer GLA-1 bestätigt werden, indem der Wildtyp und *exo-1* in Schüttelkolben für 3 Tage kultiviert wurden (Abb. 3.4). Es ist davon auszugehen, dass zu diesem Zeitpunkt bereits keine C-Quelle mehr im Medium vorhanden war. Hingegen unterscheiden sich bei Kultivierungen mit ausreichender Substratkonzentration die GLA-1-Konzentrationen im Medium kaum. Diese Ergebnisse unterstützen die Theorie der gestörten Regulation bei *exo-1*. Generell wird diese Theorie durch den intrazellulären Anstieg an GLA-1 bekräftigt (Gratzner & Sheehan, 1969). Sollte die geänderter Regulation tatsächlich der ausschlaggebende Grund für die Hypersekretion sein, so kann im Umkehrschluss *exo-1* keinerlei Auswirkungen auf die Produktion des Fusionsproteins haben, da zumeist andere Promotoren und daher eine andere Regulation die Produktion steuert. Es ist jedoch festzuhalten, dass die Einführung von *exo-1* in $\Delta vib-1$ -Stämme die Sekretion von nativer GLA-1 erhöht, da das geringe Sekretionsniveau von $\Delta vib-1$ durch *exo-1* wieder wildtypisch erscheint (Abb. 3.9). Es ist möglich, dass beide Faktoren entgegengesetzte Rollen in der Derepression des Katabolitmetabolismus spielen. Auch aufgrund der Proteaseaktivität in Schüttelkolben kann die Funktion von *exo-1* nicht eindeutig geklärt werden. Vermutet wird, dass die Hypersekretion zu einem kleinen Teil durch die Zellwandzusammensetzungen beeinflusst werden kann. Dadurch bilden sich größere Poren und das Enzym verbleibt für eine kürzere Zeit in der Zellwand. Der größere Teil wird durch die veränderte Regulation der Derepression beeinflusst. Da jedoch eine Limitierung im Produktionsprozess aufgrund von erhöhter Sekretion von Proteasen nicht erwünscht ist, kann in diesem System das volle Potential von *exo-1* nicht ausgeschöpft werden.

Aufgrund des ausbleibenden Erfolgs bei der Sekretion des Fusionsproteins wurde eine gekürzte Variante von GLA-1 verwendet (GLA_t). Diese enthielt keine stärkebindende Domäne, und *Carrier* und scFv wurden durch den nativen Linker der Glucoamylase räumlich getrennt. Dieses System sollte zwei Vorteile mit sich bringen. Der erste Vorteil sollte die separate Faltung von *Carrier* und scFv sein, welche durch die räumliche Trennung durch den Linker erleichtert werden sollte (Archer *et al.*, 1994). Im Falle der ungekürzten Variante wurde eine falsche Faltung vermutet, welche zum Abbau des Proteins durch ERAD führt (Carvalho *et al.*, 2011). Der zweite Vorteil sollte die zu dem Zeitpunkt vermutete ausbleibende Assoziation des Fusionsproteins mit der Zellwand sein und somit zur erfolgreichen Sekretion führen, da in einem Fall die Bindung von Glucoamylasen an die Zellwand über die stärkebindende Domäne gezeigt wurde (Neustroev *et al.*, 1993). Die Einführung von GLA_t (in $\Delta vib-1$ -Stämmen) führte zur erfolgreichen Sekretion des Fusionsproteins in einigen Fällen (Abb. 3.12). Es kann jedoch

nicht ausgeschlossen werden, dass das Ersetzen des 1×*myc-tags* mit dem 13×*myc-tags* sowie die Anwendung einer sensitiveren Nachweismethode ausschlaggebend für diese Ergebnisse waren. Wie bereits erwähnt, brachte die zusätzliche Einführung von *exo-1* keine zusätzliche Erhöhung der Ausbeute des Fusionsproteins im Kulturüberstand (Abb. 3.14). Sollte auch bei *N. crassa* GLA-1 über die stärkebindende Domäne binden, so hätte *exo-1* die Sekretion in das Kulturmedium nicht verbessern können, da bereits keine Assoziation mit der Zellwand bestand. Ausgehend von dieser Arbeit lässt sich nicht eindeutig klären, ob GLA-1 tatsächlich mit der Zellwand assoziiert ist und ob die stärkebindende Domäne eine Rolle in diesem Vorgang spielt. Letzteres gilt jedoch als unwahrscheinlich. In *A. niger* wurde das GLA-GFP-Fusionsprotein eindeutig mit der Zellwand assoziiert nachgewiesen (Gordon *et al.*, 2000a, b). Die verwendete Glucoamylase enthielt jedoch ebenfalls keine stärkebindende Domäne und ein Zusammenhang kann daher ausgeschlossen werden. Gemäß des Modells des molekularen Siebs wird für wahrscheinlicher gehalten, dass GLA-1 nach der Sekretion eine gewisse Zeit benötigt, um durch die Zellwand zu diffundieren (Trevithick & Metznerberg, 1966a, b).

Obwohl die verkürzte Variante des *Carrier*-Proteins zur erfolgreichen Sekretion des Fusionsproteins geführt hat (Abb. 3.27), kann ein Größeneinfluss des Produktes ausgeschlossen werden. Das auf der vollständigen Glucoamylase basierende System produzierte Fusionsproteine mit einem Molekulargewicht von 95 kD. Durch die Verkürzung von GLA-1 und die gleichzeitige Verwendung des längeren 13×*myc-tags* entstand ein 105 kD großes Protein. Sollte es eine Grenze hinsichtlich der Größe geben, bis zu welcher Proteine die Zellwand passieren können, so muss diese oberhalb von 105 kD liegen und spielt für das vorliegende Fusionsprotein keine Rolle.

Das eigentliche Problem für den fehlenden Nachweis des Fusionsproteins bei Kultivierungen im Schüttelkolbenmaßstab war wahrscheinlich nicht die Assoziation der *Carriers* mit der Zellwand, sondern die Proteaseaktivität, welche selbst bei $\Delta vib-1$ -Stämmen auftritt, wenn es zu Limitierungen von Nährstoffen kommt (Abb. 3.18). Dies wurde besonders bei der vergleichenden Kultivierung von Produktionsstämmen mit und ohne $\Delta gla-1$ deutlich, da $\Delta gla-1$ -Produktionsstämme wesentlich langsamer wuchsen und somit bei der Ernte noch keine Limitierungen erfahren hatten (Abb. 3.17). Unter diesen Bedingungen war die Proteaseaktivität wesentlich geringer als bei den schneller gewachsenen *gla-1*⁺-Produktionsstämmen (Abb. 3.16), wodurch ein Nachweis des Fusionsproteins sowie Abbauprodukten ermöglicht wurde (Abb. 3.15).

4.2.2 Promotoren

Mehrere Promotoren wurden in dieser Arbeit untersucht. Die Promotorstärke wurde hierbei indirekt über die produzierte Menge an Fusionsprotein ermittelt. Über die gebildete Transkriptmenge liegen keine Untersuchungsergebnisse vor. Da das sekretierte Protein zumeist von Proteasen abgebaut wurde, wird für den Promotorvergleich lediglich die biomasseassoziierte/intrazelluläre Fraktion herangezogen. Zunächst wurden der Glucoamylasepromotor *Pgla* (Sigmund *et al.*, 1985), der lichtinduzierbare Promotor *Pvvd* (Hurley *et al.*, 2012) sowie der durch Glucose reprimierbare Promotor *Pccg-1* (McNally & Free, 1988) verglichen. Dabei führte *Pccg-1* in allen Versuchen in Schüttelkolbenmaßstab zur höchsten Menge an Fusionsprotein.

Unter den getesteten Bedingungen ist davon auszugehen, dass kein Zucker mehr im Medium vorhanden war und es daher zu einer Derepression kam, wodurch sowohl *Pccg-1* (Wang *et al.*, 1994) als auch *Pgla* (Sigmund *et al.*, 1985) dereprimiert sein sollten. Zusätzlich wird *Pgla* durch Stärke und Stärkeabbauprodukten induziert (Koh-Luar *et al.*, 1989). *Pgla* führte jedoch unabhängig von der verwendeten Zuckerquelle zur geringsten Menge an Fusionsprotein (Abb. 3.12). Zum einen zeigt sich, dass *Pgla* kein durch Glucose reprimierbarer Promotor ist, zum anderen führt die Induktion durch Maltose zu keiner feststellbaren Erhöhung der intrazellulären Produktkonzentration. Ein Vergleich mit dem Glucoamylase-Promotor aus *A. niger* zeigt ein ähnliches Verhalten, da auch hier selbst Glucose die Bildung der mRNA induzierte und es nur geringe Unterschiede in der Transkriptmenge gab bei Kultivierungen auf Glucose und Maltose (Ganzlin & Rinas, 2008). Als Promotor *Pgla* wurde der 1000 bp stromaufwärts des *gla-1*-Gens gelegene DNA-Abschnitt verwendet. Dieser enthält für Promotoren übliche Sequenzelemente und wurde auch in anderen Arbeiten bereits verwendet (Stone *et al.*, 1993). Der Wildtyp sekretiert unter induzierenden Bedingungen (Maltose) GLA-1 in großen Mengen, unter reprimierenden Bedingungen (Glucose) werden nur geringe Mengen GLA-1 freigesetzt. Folgt auf die Induktion die Derepression durch Zuckermangel, so wird GLA-1 verstärkt sekretiert (Abb. 3.1 und Abb. 3.2). Es ist jedoch möglich, dass nicht alle für die Induktion/Derepression benötigten Sequenzabschnitte im verwendeten DNA-Abschnitt enthalten sind und daher *Pgla* nicht zur erwarteten Produktmenge führt.

Auch *Pvvd* führte zu weniger Produkt als *Pccg-1*. Der lichtinduzierbare Promotor wird im Wildtyp von seinem eigenen Genprodukt VVD reprimiert. Eine Deletion des *vvd*-Gens beseitigt daher diese Repression des Promotors und führt zu mehr Transkript und Produkt als *Pccg-1* (Hurley *et al.*, 2012). Es war daher zu erwarten, dass nach Einführung der *vvd*-Deletion

mit diesem Promotor mehr Produkt erhalten werden kann als mit *Pccg-1*. Obwohl Δvvd zu einer leichten Erhöhung der intrazellulären Produktkonzentration geführt hat, wurde mit *Pccg-1* weiterhin wesentlich mehr Produkt erhalten. In der späteren Kultivierung im parallelen Bioreaktorsystem bestätigte sich dieses Ergebnis erneut. Eine genauere Analyse der Ergebnisse von Hurley *et al.* zeigt jedoch, dass die Deletion des *vvd*-Gens lediglich in den ersten Stunden nach Induktion zu mehr Transkript und Produkt führt und nach 8 Stunden kein Unterschied zwischen dem Δvvd -Stamm und dem *vvd*⁺-Stamm besteht. Alle in dieser Arbeit durchgeführten Kultivierungen dauerten wesentlich länger, wodurch dieser Effekt nicht zum Tragen kommen konnte, insbesondere, da die Lichtinduktion von Beginn an stattfand.

Im Schüttelkolbenmaßstab führte *Pccg-1* unter allen verwendeten Bedingungen zur höchsten Menge an biomasseassoziiertem heterologen Produkt. Dies deutet darauf hin, dass entweder die Repression durch Glucose die Transkription entweder nicht komplett verhindert oder dass die Zuckerquelle bereits verbraucht war und der Effekt der Derepression einsetzte. Nur mit diesem Promotor gelang der extrazelluläre Nachweis des vollständigen Fusionsproteins im Schüttelkolbenmaßstab. Der Grund hierfür kann allerdings nicht klar bestimmt werden, da mehrere Faktoren bei der Produktion und Sekretion eine Rolle spielen. So gibt es häufig einen Zusammenhang zwischen Transkriptmenge und Produktmenge (Curran *et al.*, 2013). Eine hohe Transkriptmenge muss jedoch nicht immer zu einer höheren Produktmenge führen (Allgaier *et al.*, 2010; Maier *et al.*, 2009). Nach der Sekretion kann das Fusionsprodukt an die Zellwand binden (siehe Abschnitt 4.2.1). Gelangt das Protein anschließend in den Kulturüberstand, so kann es durch die ebenfalls sekretierten Proteasen wieder abgebaut werden. All diese Faktoren müssen daher berücksichtigt werden.

Interessanterweise konnte auch die gekürzte Glucoamylase ohne scFv unter Kontrolle von *Pgla* im Kulturüberstand nachgewiesen werden, obwohl dies beim vollständigen Fusionsprotein nicht gelang. Da es sich um den identischen Promotor handelte, muss ein anderer Grund als ein zu schwacher Promotor entscheidend für die erfolglose Sekretion des vollständigen Fusionsproteins gewesen sein. Fehlender Abbau von GLA₁₋₁₃×MYC durch Proteasen (fehlendes Antikörperfragment) und verringerte Größe des Proteins stellen dabei zwei Möglichkeiten dar. Ebenfalls zu erwähnen ist, dass die unterschiedlichen Produktionsstämme zum Teil das heterologe Produkt mit variierendem apparentem Molekulargewicht produziert haben. Eine Möglichkeit wäre ein unterschiedlicher Grad der Glykosylierung, welcher das Molekulargewicht beeinflussen kann (Nandy *et al.*, 2005). Bei Säugetierzellen konnte nachgewiesen werden, dass die Kultivierungsbedingungen einen Einfluss auf das

Glykosylierungsmuster haben können (Rödig *et al.*, 2013), ein ähnlicher Effekt wäre daher auch bei *N. crassa* denkbar.

Im Bioreaktor wurden die Produktion mit den Promotoren *Pvvd*, *Pccg-1* und *PccgInr*, welcher nicht mehr durch Glucose reprimierbar sein soll (Wang *et al.*, 1994), verglichen. Trotz der Verwendung von Δvvd -Stämmen wurde mit *Pvvd* wesentlich weniger Produkt erhalten als mit *Pccg-1* und *PccgInr*. Durch das kontrollierte Wachstum im Bioreaktor kann der Effekt von unterschiedlicher Proteaseaktivität ausgeschlossen werden, wodurch eindeutig festgelegt werden kann, dass für die Produktion heterologer Proteine in *N. crassa* *Pccg-1* wesentlich besser geeignet ist als *Pvvd*.

Der Vergleich von *Pccg-1* und *PccgInr* ist hingegen weniger eindeutig. Allerdings kann eine Repression von *Pccg-1* durch Glucose, welche bei der Spaltung des verwendeten Substrats Maltose frei wird, eindeutig ausgeschlossen werden, da hohe Mengen an heterologem Produkt nachgewiesen werden konnten (Abb. 3.27). Laut Western Blot scheint jedoch durch die Verwendung von *PccgInr* mehr Protein sekretiert worden zu sein als bei *Pccg-1*. Insbesondere nach 24 h liegt bei *PccgInr* wesentlich mehr Protein vor und bei Erreichen der Absterbephase konnte bei *PccgInr* weiterhin vollständiges Fusionsprotein detektiert werden, während bei *Pccg-1* lediglich Abbauprodukte nachgewiesen wurden. Für eine klare Aussage wären jedoch Quantifizierungen mittels ELISA notwendig. Die Einführung der beiden Deletionen in *PccgInr* hat jedoch definitiv die Produktion nicht verschlechtert, wodurch es sich empfiehlt auch weiterhin diesen Promotor zu verwenden.

Neben den in dieser Arbeit verwendeten Promotoren wurden weitere Promotoren aus *N. crassa* beschrieben. Der *cfp*-Promotor wird durch Glucose induziert und durch Ethanol reprimiert (Temporini *et al.*, 2004). Die Verwendung dieses Promotors könnte daher die einfache Kultivierung auf Glucose ohne Katabolitrepression ermöglichen. Weitere regulierbare Promotoren sind der durch Kupfer reprimierbare *tcu-1*-Promotor, welcher durch die Bindung von Kupfer an einen Komplexbildner induziert wird (Lamb *et al.*, 2013). Im Gegensatz hierzu wird der *CuMT*-Promotor durch Kupfer induziert (Münger *et al.*, 1987; Schilling *et al.*, 1992). Der Promotor des *tef-1*-Gens ist in jungem Myzel und ausreichender Nährstoffkonzentration aktiv (Ichi-ishi & Inoue, 1995), *Pacu-5* wird durch Acetat induziert (Collins *et al.*, 1991). All diese Promotoren wurden allerdings bislang nicht verglichen und würden zu einem komplexen Kultivierungsverfahren führen, wodurch eine Verwendung nicht empfohlen wird. Ein konstitutiver Promotor, welcher zu ungefähr gleichen Produktmengen führt, ist der Tubulin-Promotor *Ptub*, welcher in einem Fall verwendet wurde (Nakano *et al.*, 1993). Für die Optimierung der Produktion wäre ein Vergleich bekannter Promotoren auf Transkriptebene

hilfreich, um zu untersuchen, ob Transkript- und Produktmenge korrelieren. Bei den induzierbaren bzw. reprimierbaren Promotoren könnte zusätzlich eine Mutagenese zur Ertragssteigerung führen.

4.2.3 Codon Usage

Vergleiche von tRNA-Vorkommen in verschiedenen Organismen haben gezeigt, dass jeder Organismus eine einzigartige Zusammensetzung des tRNA-Pools besitzt. Als Folge werden bestimmte Codons präferiert, wodurch die Codonzusammensetzung die Geschwindigkeit der Translation beeinflussen kann (Angov, 2011). Eine Analyse der Codonverteilung in *N. crassa* hat ergeben, dass Pyrimidinbasen an dritter Position des Codons bevorzugt werden (Edelmann & Staben, 1994). Ein erster Schritt bei der Expression heterologer Proteine ist daher die Anpassung der *Codon usage* an die des Produktionswirtes (Te'o *et al.*, 2000). Die am häufigsten verwendete Strategie für die Codonanpassung ist die Verwendung der am häufigsten vorkommenden Codons im Zielorganismus. Dadurch sollen seltene Codons vermieden werden, wodurch die Elongation der Translation schnellstmöglich abläuft. Mit dieser Vorgehensweise wurde bei *N. crassa* die Produktion zahlreicher Proteine um ein Vielfaches gesteigert (Gooch *et al.*, 2008; Nelson *et al.*, 2004). Nicht immer jedoch führt diese Strategie zur Erhöhung der Produktion des heterologen Proteins (Zhou *et al.*, 2013). Die Codon- und Nukleotidzusammensetzung der mRNA haben einen großen Einfluss auf zahlreiche Faktoren wie mRNA-Stabilität, Proteinfaltung und folglich Expressionslevel (Marin, 2008; Plotkin & Kudla, 2011). Der GC-Gehalt der mRNA beeinflusst die Sekundärstruktur der mRNA, welche wiederum Auswirkungen auf die Translationsinitiation sowie -elongation hat (Allert *et al.*, 2010; Gu *et al.*, 2010). Seltene Codons scheinen insbesondere bei der Translation eine zentrale Rolle einzunehmen. Obwohl die Einführung von seltenen Codons häufig zur Verringerung der Translationseffizienz führen kann (Kinnaird *et al.*, 1991), scheinen sie einen positiven Einfluss auf die Faltungsqualität des Proteins zu haben. Seltene Codons kommen häufig an spezifischen Positionen in der mRNA vor. Untersuchungen haben ergeben, dass die ersten 40 Nukleotide der mRNA einen erheblichen Einfluss auf die Translationsinitiation haben. In diesem Abschnitt kommen häufig seltene Codons vor, da damit der Initiationskomplex stabilisiert wird, weil die Ribosomen länger an diesen Codons verbleiben (Kudla *et al.*, 2009). mRNA-Abschnitte, welche α -helicale Strukturen codieren, enthalten meist häufige Codons, β -Faltblätter-codierende Sequenzabschnitte hingegen beinhalten seltene Codons (Thanaraj & Argos, 1996). Bereiche mit seltenen Codons werden langsamer translatiert, wodurch das naszierende

Polypeptid mehr Zeit zum Falten erhält und somit inkorrekte Faltung vermieden wird (Zalucki *et al.*, 2010). Anstatt einer Codonoptimierung basierend auf der Verwendung der häufigsten Codons wurde daher eine Codon-Harmonisierung vorgeschlagen (Angov *et al.*, 2008). Der zugrunde liegende Algorithmus berücksichtigt seltene Codons im Ursprungsorganismus und übersetzt diese in vergleichbare Codons im Zielorganismus. Proteinbereiche zwischen α -Helices wie Linkerbereiche werden mit seltenen Codons versehen, wodurch die Translation verlangsamt wird und sich die Tertiärstruktur korrekt falten kann. Mit diesem Ansatz wurden in *E. coli* Produktmengen um den Faktor 1000 erhöht (Angov *et al.*, 2008). Andere Arbeiten bestätigten die Rolle des GC-Gehaltes und seltener Codons und zeigten zugleich, dass die Verwendung von nur häufigen Codons nicht zu höchsten Produktmengen führt (Karimi *et al.*, 2015; Kudla *et al.*, 2009; Menzella, 2011). Dabei wurde hervorgehoben, dass starke Sekundärstrukturen im 5'-Bereich der mRNA aufgrund von unpassendem GC-Gehalt die Translationsinitiation verschlechtert und somit auch die Produktmenge herabsetzt.

In dieser Arbeit wurde die *Codon usage* des heterologen Gens angepasst, indem hauptsächlich die häufigsten *N. crassa*-Codons verwendet wurden. In allen Fällen führte dies im Vergleich zum nicht optimierten Gen zu einer Erhöhung der biomasseassoziierten Produktmenge. Eine Analyse der Gensequenz des scFv HT186-D11 hat ergeben, dass in den ersten 40 bp der mRNA nach der Optimierung fast ausschließlich häufige Codons enthalten sind (Daten nicht gezeigt). Das ursprüngliche Gen (stammend aus einer humanen Genbibliothek) enthält hingegen zahlreiche seltene Codons. Eine Möglichkeit der Optimierung wäre daher die Anpassung der Codonverteilung durch die gezielte Einführung seltener Codons sowohl im 5'-Bereich der mRNA als auch in der Linkerregion des scFv entsprechend des Modells der Codon-Harmonisierung. Eine Analyse der Sekundärstruktur könnte ebenfalls mögliche Haarnadelstrukturen aufzeigen, welche durch die Anpassung des GC-Gehaltes vermieden werden könnten. Eine suboptimale Codonverteilung könnte ein Grund sein, warum der Antikörper D1.3 zu keinem Zeitpunkt produziert wurde. Dies könnte zu einer instabilen mRNA geführt haben, welche in Folge dessen sofort abgebaut wurde und daher nicht translatiert werden konnte. Eine weitere Möglichkeit ist die inkorrekte Faltung von D1.3 durch eine zu schnelle Translation, wodurch das Protein durch das Qualitätskontrollsystem abgebaut wurde.

Eine häufige Erklärung für eine ausbleibende Produktion ist das Fehlen von Introns. Häufig kann die Einführung von Introns die Produktausbeute erhöhen (Su *et al.*, 2012). Dieser Effekt kann jedoch nicht der Grund für die fehlende Produktion von D1.3 sein, da das *Carrier*-Protein

ein 62 bp langes Intron enthält und daher die Produktion diesbezüglich unabhängig vom heterologen Produkt ist.

Durch die Verringerung der Kultivierungstemperatur von 30 °C auf 15 °C wurde versucht, die Translation zu verlangsamen und somit durch eine erhöhte Faltungsqualität die Produktmenge zu erhöhen (Zalucki *et al.*, 2010). In *N. crassa* konnte über eine analoge Vorgehensweise die inkorrekte Faltung des FRQ-Proteins unterbunden werden (Zhou *et al.*, 2013). In dieser Arbeit hingegen konnte durch diese Vorgehensweise die Produktmenge nicht erhöht werden. Zwar gelang dadurch der erstmalige Nachweis von GLA-1-HT186-D11 im Kulturüberstand, dies wird jedoch wahrscheinlich an der verringerten Proteaseaktivität durch die niedrige Temperatur gelegen haben (Guo *et al.*, 2011).

Codon usage ist lediglich einer von vielen Faktoren, welche die mRNA-Stabilität beeinflussen. Dennoch kann eine AT-reiche Region fälschlicher Weise als Polyadenylierungssignal interpretiert werden, wodurch die Transkription vorzeitig abgebrochen und eine Poly-A-Kette angehängt wird. Dies kann durch die Anpassung des GC-Gehaltes unterbunden werden (Sasaguri *et al.*, 2008). Weitere Einflüsse sind Sekundärstrukturen, welche entweder durch bestimmte Proteine gebunden und somit stabilisiert werden oder im Gegensatz dazu von Nukleasen als Erkennungsstruktur dienen und somit zum Abbau führen. Insgesamt wird die mRNA-Halbwertszeit sowohl vom kodierenden Bereich als auch durch die 5' und 3' UTR-Regionen (*untranslated regions*) bestimmt (Ross, 1996). Durch die Wahl von zum Teil synthetischen Terminatoren konnte so zum Beispiel über die gesteigerte Halbwertszeit der mRNA die Produktausbeute um ein Vielfaches erhöht werden (Curran *et al.*, 2013, 2015).

4.3 Wachstumsverhalten von *N. crassa* und Prozessoptimierung

Die Kultivierungsverläufe im Schüttelkolben- sowie im Bioreaktormaßstab sind nahezu identisch. Die im Schüttelkolben erhaltenen Biomassen- und pH-Wert-Verläufe zeigen einen typischen Verlauf einer *N. crassa*-Kultivierung (Gratzner & Sheehan, 1969; Rasmussen-Wilson *et al.*, 1997; Wen Su & Jun He, 1997). Im Bioreaktor entspricht das Wachstum dem Verlauf einer bakteriellen Kultivierung (siehe Einleitung). Nach einer kurzen Anpassungsphase kommt es zu exponentiellem Wachstum, gefolgt von einer kurzen stationären Phase. Anschließend baut der Pilz über Autolyse seine eigene Biomasse wieder ab (Gratzner & Sheehan, 1969). In beiden Maßstäben sinkt der pH-Wert des Medium ab. Eine mögliche Erklärung hierfür beruht auf der Eigenschaft filamentöser Pilze, ihre Umgebung

durch die Sekretion organischer Säuren anzusäuern (Liaud *et al.*, 2014). Dem steht jedoch entgegen, dass bislang keine Produktion organischer Säuren bei *N. crassa* beschrieben wurde. Eine zweite Möglichkeit steht im Zusammenhang mit der Aufnahme von Ionen. So wurde berichtet, dass *N. crassa* ein Austauschsystem für Kaliumionen gegen Natrium- und Wasserstoffionen besitzt (Slayman & Slayman, 1968). Die Wasserstoffionen bilden mit Wasser H_3O^+ -Ionen, was zum Absinken des pH-Wertes führt. Bei *Penicillium cyclopium* wurde nachgewiesen, dass die Aufnahme von Ammoniumionen mit der Ausscheidung von Wasserstoffionen gekoppelt ist (Roos & Luckner, 1984). Es liegt daher nahe, dass bei *N. crassa* ein ähnlicher Mechanismus für die Aufnahme von Ammonium vorliegt. Die Ansäuerung ist wahrscheinlich ein Zusammenspiel der beiden letztgenannten Möglichkeiten.

Das Wachstum auf Glucose als alleinige C-Quelle unterscheidet sich vom Wachstum auf Maltose, da der Pilz wesentlich schneller auf Glucose als auf Maltose wächst. Der wahrscheinliche Grund für das langsamere Wachstum auf Maltose ist die Spaltung von Maltose zu Glucose, welche von der Glucoamylase zunächst katalysiert werden muss, bevor der Pilz den Zucker aufnehmen kann (Lu *et al.*, 2010). Sowohl im Schüttelkolben- als auch im Bioreaktormaßstab wird GLA-1 hauptsächlich nur bei Induktion durch Maltose sekretiert. Insbesondere im größeren Maßstab kann nun mit Sicherheit festgehalten werden, dass die GLA-1-Sekretion auch durch Induktion über Maltose eingeleitet wird, da bereits nach 19 h GLA-1 eindeutig detektiert wurde und es keinen Unterschied in der GLA-1-Konzentration in der späten Wachstumsphase (29 h) und der Absterbephase (43 h), in welcher Katabolitderepression auftritt, gibt.

Die anschließende Medienoptimierung zeigte, dass das verwendete Minimalmedium nicht für die Proteinproduktion ausgelegt ist, da das Verhältnis von C- und N-Quelle nicht optimal ist und ein Stickstoffmangel im Medium vorherrscht. Vogel's Minimalmedium enthält Ammoniumnitrat als Stickstoffquelle (Vogel, 1956). Beide Stickstoffverbindungen können von *N. crassa* als N-Quelle verwendet werden (Davis, 2000). Für die Medienoptimierung wurde daher ein Wechsel auf Bird Medium vollzogen, da dieses nur noch Ammoniumchlorid als alleinige Stickstoffquelle enthält und somit genauer reguliert werden kann. Die Untersuchung mit unterschiedlichen Konzentrationen an Ammoniumchlorid hatte ergeben, dass für eine Maltosekonzentration von 20 g/L (entspricht 58 mM) ca. 52 mM an Ammonium benötigt werden, damit der Zucker vollständig verbraucht werden kann. Dies entspricht einem atomaren C/N-Verhältnis von 13:1. Vor der Optimierung lag dieses Verhältnis für Bird mit Maltose bei 28:1 und für Vogel's Medium bei 14:1 (unter Berücksichtigung beider Stickstoffverbindungen). Insbesondere das Bird Medium hatte daher ein ungünstiges

C/N-Verhältnis. Dieses ungünstige Verhältnis sowie die gleichzeitige Sekretion von Proteasen waren daher die Gründe für den fehlenden Nachweis heterologer Proteine. Das optimierte Bird Medium besitzt nun ein C/N-Verhältnis von 11:1, wodurch ohne Limitierungen 20 g/L Maltose verstoffwechselt werden können. Die Biomasse von Pilzen besitzt eine geschätzte chemische Zusammensetzung in der Form $C_{10}H_{17}O_6N$ (Cervantes *et al.*, 2006) und somit ein C/N-Verhältnis von 10:1. Beim Verbrauch der Zuckerquelle entsteht neben der Biomasse auch CO_2 . Somit muss das C/N-Verhältnis im Medium etwas höher liegen und könnte sich daher im Bereich des optimierten Mediums befinden. Hinzu kommt, dass Energie für die Aufrechterhaltung des Metabolismus benötigt wird (Righelato *et al.*, 1968). Für die Produktion von homologen sowie heterologen Proteinen werden jedoch meist wesentlich geringere C/N-Verhältnisse im Medium eingesetzt (Tab. 4.2), um einen Stickstoffmangel zu vermeiden.

Tab. 4.2: C/N-Verhältnisse bei der Produktion von Proteinen mit filamentösen Pilzen. Das atomare C/N-Verhältnis wurde auf Basis der publizierten Mengen an Kohlenstoff- und Stickstoffquellen berechnet.

| Organismus | Produkt | Stickstoffquelle | C/N-Verhältnis | Quelle |
|----------------------------|---------------|---------------------------|----------------|---------------------------------|
| <i>Aspergillus niger</i> | Glucoamylase | NH_4NO_3 | 4 | Swift <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>Aspergillus niger</i> | Glucoamylase | $(NH_4)_2SO_4$ | 6 | Pedersen <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Aspergillus awamori</i> | scFv | $(NH_4)_2SO_4$, $NaNO_3$ | 2 | Sotiriadis <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>Trichoderma reesei</i> | Endoglucanase | $(NH_4)_2SO_4$ | 2 | Zhang <i>et al.</i> , 2014 |

In Medien, welche für *N. crassa*-Kultivierungen verwendet werden (Davis & Serres, 1970), sind die C/N-Verhältnisse wesentlich höher als in den Produktionsmedien anderer Pilze (Tab. 4.3). Der Grund hierfür ist, dass *N. crassa* selten für Produktionszwecke eingesetzt wird und das Medium diesbezüglich nicht auf ein optimales C/N-Verhältnis angepasst wurde. Eine Ausnahme hiervon bildet das Fries' Medium, welches bislang nur vereinzelt für Kultivierungen verwendet wurde (Wen Su & Jun He, 1997). Für eine weitere Optimierung würde es sich daher empfehlen, die Ammoniumkonzentration anzuheben, um einen Überschuss an Stickstoff im Medium zu erhalten, wie es bei Fries' Medium der Fall ist.

Tab. 4.3: C/N-Verhältnisse in Medien, welche für *N. crassa*-Kultivierungen verwendet werden. Das atomare C/N-Verhältnis wurde auf Basis der publizierten Mengen an Kohlenstoff- und Stickstoffquellen berechnet.

| Medium | Kohlenstoffquelle | Stickstoffquelle | C/N-Verhältnis | Quelle |
|-----------------|-------------------|---|----------------|----------------------|
| Vogel's | Saccharose | NH ₄ NO ₃ | 14 | Vogel, 1956 |
| Bird | Glucose | NH ₄ Cl | 24 | Metzenberg, 2004 |
| Bird, optimiert | Maltose | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 11 | diese Arbeit |
| Fries' | Saccharose | NH ₄ -Tartrat, NH ₄ NO ₃ | 4 | Davis & Serres, 1970 |

Durch die Regelung des pH-Wertes konnte im parallelen Bioreaktorsystem der Einfluss des pH-Wertes auf das Wachstum untersucht werden. Diese Kultivierungen hatten gezeigt, dass *N. crassa* in Bird Medium nur oberhalb eines pH-Wertes von pH 3 und unterhalb von pH 8 wächst. Die höchste maximale spezifische Wachstumsrate wird bei einem pH-Wert von 5,5 bis 6,0 erreicht (Abb. 4.1). Das Wachstum in flüssigem Medium unterscheidet sich daher unter den gegebenen Bedingungen leicht vom Wachstum auf Agaroberflächen, bei welchem die höchste Wachstumsrate bei pH 4,5 erreicht wurde (Ruoff *et al.*, 2000).

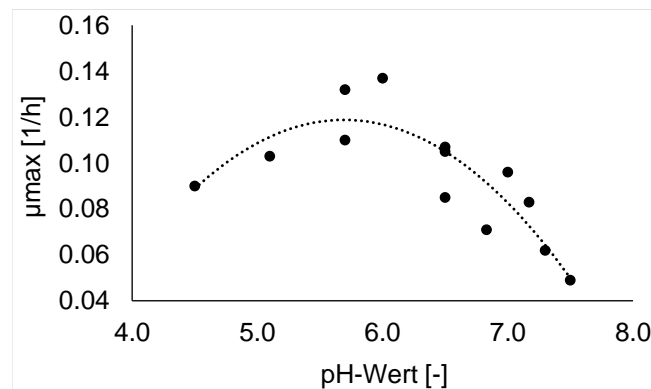


Abb. 4.1: Abhängigkeit der maximalen spezifischen Wachstumsrate μ_{\max} vom pH-Wert des Mediums. Aufgetragen wurden die μ_{\max} -Werte aller Kultivierungen des Stammes DHN-201 (*his-3⁺::Pvvd-glat-ht186-13xmyc, exo-1, Δvib-1, Δvvd*) in optimierten Bird Medium bei Wachstum auf Maltose.

Der Vergleich von Wachstum auf Glucose und Maltose hat gezeigt, dass der Pilz auf Glucose wesentlich schneller wächst. Die Wachstumsgeschwindigkeit beim Wachstum auf Maltose scheint folglich von der Aktivität der Glucoamylase im Kulturüberstand abhängig zu sein. GLA-1 ist in einem pH-Bereich zwischen 3,2 und 6,8 aktiv (Sigmund *et al.*, 1985). Das Optimum liegt ungefähr bei einem pH-Wert von 5,2 (Sigmund *et al.*, 1985; Spinelli, 1996) und somit ungefähr im Bereich der höchsten Wachstumsgeschwindigkeit von *N. crassa* unter den gegebenen Kultivierungsbedingungen. Das Absterben bei zu geringen oder zu hohen

pH-Werten lässt sich hierdurch ebenfalls erklären. Die Zusammensetzung des Mediums hat auch einen Einfluss auf das Wachstum bei extremen pH-Werten. Ein Vergleich des Wachstums auf verschiedenen C-Quellen in optimierten Bird Medium und Vogel's Medium hatte gezeigt, dass in Vogel's Medium Wachstum sogar bei pH 9 möglich ist, während in Bird Medium kein Wachstum verzeichnet wurde (Daten nicht gezeigt). Dies wird durch andere *N. crassa*-Kultivierungen bestätigt (Allgaier *et al.*, 2010).

Andere filamentöse Pilze zeigen ähnliche pH-Wert-Optima in Bezug auf die maximale spezifische Wachstumsrate. *A. niger* besitzt bei Wachstum auf Glucose ein sehr breites Optimum zwischen den pH-Werten 3 und 7, in welchem sich μ_{\max} kaum verändert (Carlsen *et al.*, 1996; Pedersen *et al.*, 2000). Es wird angenommen, dass das Wachstum stark von der Zuckerquelle bestimmt wird, da die Wachstumsgeschwindigkeit von der Aktivität des zuckerabbauenden Enzyms abhängig ist. Bei *A. niger* ist so z. B. das Wachstum auf Carboxymethylcellulose bei pH 4 am schnellsten und bei pH 7 am langsamsten (Sohail *et al.*, 2009).

Die maximale spezifische Wachstumsrate bei der Kultivierung von *N. crassa* in Vogel's Minimalmedium mit Glucose betrug $0,22 \text{ h}^{-1}$ (μ_{\max, CO_2}). Bei vergleichbaren Bedingungen betragen μ_{\max} -Werte bei *A. niger* zwischen $0,18 \text{ h}^{-1}$ (Pedersen *et al.*, 2000) und $0,24 \text{ h}^{-1}$ (Swift *et al.*, 1998). *Aspergillus flavus* hingegen wächst mit $0,07 \text{ h}^{-1}$ wesentlich langsamer (Rosfarizan & Ariff, 2000). Für *N. crassa* wurde ein wesentlich höherer μ_{\max} -Wert von $0,37 \text{ h}^{-1}$ angegeben (Alberghina, 1973). Dies zeigt erneut, dass *N. crassa* zu den am schnellsten wachsenden Pilzen gehört. Dennoch wachsen Hefen wie *S. cerevisiae* ($\mu_{\max} = 0,46 \text{ h}^{-1}$) und das Bakterium *E. coli* ($\mu_{\max} = 0,89 \text{ h}^{-1}$) wesentlich schneller (Andersen & Von Meyenburg, 1980; Waldron & Lacroute, 1975), wodurch sich der Vorteil dieser Organismen gegenüber filamentösen Pilzen zeigt.

Nach der Prozessoptimierung wurden Produktionsstämme in optimiertem Bird Medium (definiertes Medium) und Komplexmedium kultiviert. Unabhängig vom genetischen Hintergrund war das Wachstum in Komplexmedium wesentlich schneller als im definierten Medium. Dieser positive Einfluss der komplexen Bestandteile wurde auch bei der Kultivierung von *A. niger* und *P. chrysogenum* beobachtet (Bull & Trinci, 1977). Analog hierzu konnte bei *Aspergillus flavus*-Kultivierungen eine höhere Biomasse und Produktivität auf komplexen Stickstoffquellen wie Hefeextrakt als auf definierten wie Ammoniumsulfat festgestellt werden (Rosfarizan & Ariff, 2000). Als Ursache für diesen Effekt wurden freie Aminosäuren vermutet, welche in den komplexen Bestandteilen enthalten sind und sich positiv auf die Synthese bestimmter Enzyme auswirken können. Eine Optimierung des definierten Mediums wäre daher

z. B. durch die Zugabe definierter Aminosäuren möglich. Neben dem schnellen Wachstum könnte zusätzlich auch die Produktion extrazellulärer Proteasen, welche im Produktionsstamm noch nicht deletiert sind, reprimiert werden (siehe Abschnitt 4.1).

Zusätzlich zum schnelleren Wachstum haben beide Produktionsstämme im komplexen Medium doppelt so viel heterologes Protein hergestellt wie im definierten Medium. Dies hängt allerdings wahrscheinlich mit der höheren Biomassekonzentration zusammen. Die Produktionskapazität der Zellen scheint daher nicht von den Medienbestandteilen betroffen zu sein. Der auf Einzeldelationen von Proteasegenen basierende Stamm (DHN-270) hat insbesondere kurz nach Beginn der Absterbephase mehr Produkt in das Medium abgegeben als der $\Delta vib-1$ -Produktionsstamm (DHN-252). Offensichtlich sekretiert in dieser Phase ein $\Delta vib-1$ -Stamm allgemein weniger Proteine, wodurch auch weniger heterologes Protein in das Medium gelangt. Dieser Effekt konnte sowohl in Schüttelkolben als auch in Bioreaktoren festgestellt werden. Da DHN-270 in dieser Phase weiterhin keine Proteaseaktivität aufzeigt, führt die Verwendung von diesem Stamm zu höheren Produktausbeuten. Die fehlende Proteaseaktivität ist unter beiden Bedingungen bei der anschließenden Proteinaufreinigung entscheidend für wesentlich höhere Mengen an isoliertem Protein im Vergleich zu DHN-252. Zieht man zusätzlich in Betracht, dass $\Delta vib-1$ -Produktionsstämme in einigen Fällen einen unerklärlichen Wachstumseinbruch verzeichnen, eignet sich DHN-270 wesentlich besser für die Produktion heterologer Proteine als DHN-252.

Nach dem Scale-Up des Arbeitsvolumens von 0,8 L auf 9,0 L blieben alle vergleichbaren Wachstumsverläufe gleich. Einzig die berechnete Biomassekonzentration unterschied sich nahezu um Faktor 2. Obwohl das Medium eine identische Zusammensetzung hatte, wurden im großen Maßstab nur ca. 8 g/L, während im kleinen Maßstab fast 14 g/L gemessen wurden. Allerdings wurden identische Abgasverläufe verzeichnet, wodurch eine unterschiedliche Biomasse unwahrscheinlich ist und daher erörtert werden muss, welcher Wert dem tatsächlichen Biomassewert näher kommt. Ausgehend von der chemischen Biomassezusammensetzung $C_{10}H_{17}O_6N$ (Cervantes *et al.*, 2006) kann für ein definiertes Medium die maximal mögliche Biomasse errechnet werden, da gemessen wurde, wie viel Ammonium verbraucht wird, wenn eine definierte Menge an C-Quelle verstoffwechselt wird (Tab. 3.2). Auch aus den Werten für gebildetes CO_2 und der eingesetzten Maltosemenge kann über die chemische Summenformel der Biomasse die maximal mögliche Biomasse berechnet werden. In beiden Fällen sind ca. 12,8 g/L BTM möglich. Wenn noch zusätzlich die Näherung um die Erhaltungsenergie ergänzt wird und berücksichtigt wird, dass sekretierte Proteine in die

Summenformel der Biomasse hineingezählt werden, so werden mögliche 10 g/L an Biomasse geschätzt. Diese Werte wurden in den meisten Kultivierungen in optimiertem Bird Medium tatsächlich erreicht.

All diese Annahmen gelten jedoch nicht für Komplexmedium, da hier weitere C- und N-Quellen in Form von Peptiden und Aminosäuren vorhanden sind. Eine Abschätzung der möglichen Biomassemenge ist daher nicht möglich.

Auch das Probenahmeverfahren kann die apparente Biomassekonzentration beeinflussen, indem eine systematische Messabweichung vorliegt. So könnte zum Beispiel beim parallelen Bioreaktorsystem, in welchem die Proben über ein Tauchrohr mit 4 mm Innendurchmesser entnommen werden, relativ gesehen eine höhere Biomasse- als Volumenmenge entnommen worden sein. Die gemessene Biomassekonzentration liegt in einem solchen Fall dann immer um einen gewissen Prozentsatz zu hoch. Da nur kleine Proben (3 ml) für die Biomassebestimmung verwendet und auf 1 L extrapoliert wurden, kann auch eine kleine Abweichung eine große Auswirkung haben. Die Probenahme am 10 L-Reaktor geschieht über ein Probenahmeventil an der unteren Seite des Reaktor (siehe Material und Methoden), welches einen wesentlich größeren Durchmesser besitzt. Zusätzlich wurde nach Ernte des Reaktors die Biomassenbestimmung der letzten Probe wiederholt, wodurch diese letzte Probe auch unabhängig vom Probenahmerohr bestimmt wurde (Daten nicht gezeigt). Da sich die Werte nicht unterschieden, wird davon ausgegangen, dass die Werte des großen Maßstabs den wahren Werten entsprechen. Eine Vermutung ist, dass die Biomasse im kleinen Maßstab zu einem höheren Grad zusammenhängt, wodurch bei der Probenahme aus dem parallelen Bioreaktorsystem ein höherer Biomassen- als Volumenanteil dem Reaktor entnommen wird.

Die Bewertung der Wachstumsgeschwindigkeit kann über den Vergleich der μ_{\max} -Werte erfolgen. Hierfür wird der natürliche Logarithmus der Biotrockenmasse gegen die Zeit aufgetragen und über die Steigung μ_{\max} berechnet. Durch schwankenden Biomassewerte weisen μ_{\max} -Werte jedoch eine gewisse Ungenauigkeit auf. Daher wurde bei der Aufstellung des Fed-Batch-Verfahrens die spezifische Wachstumsrate auf Basis der gebildeten CO_2 -Menge berechnet (μ_{\max, CO_2}). Durch die Einführung von Online-Daten entfällt der durch die Biomasse eingebrachte Fehler. Bei dieser Berechnung wird jedoch davon ausgegangen, dass sämtliches Substrat in Biomasse und CO_2 umgewandelt wird, wodurch gebildete Biomasse und gebildetes CO_2 proportional zueinander sind. Ein Faktor in der Energiebilanz ist jedoch auch, dass der Organismus einen Teil des Substrates für die Aufrechterhaltung bereits gebildeter Biomasse

aufwenden muss, ohne dass neue Biomasse gebildet wird. Für die Änderung des Substrates ergibt sich daher Gleichung 11 (Righelato *et al.*, 1968).

$$\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dx}{dt} + mx \quad \text{Gleichung 11}$$

| | |
|-----------|---|
| S | Substratkonzentration [g/L] |
| t | Zeit [h] |
| $Y_{X/S}$ | Ertragskoeffizient [$\text{g}_{\text{BTM}}/\text{g}_{\text{Substrat}}$] |
| x | BTM-Konzentration [g/L] |
| m | <i>maintenance coefficient</i> (Erhaltungskoeffizient) |

Da Faktor m jedoch nicht bekannt ist, wurde die Vereinfachung getroffen, dass CO_2 nur bei der Bildung neuer Biomasse gebildet wird. Bei *A. niger* wurden Werte für diesen Faktor berechnet und vorgeschlagen, dass es sich für filamentöse Pilze nicht um einen signifikanten Faktor handelt, wodurch er bei einer Annäherung vernachlässigt werden kann (van Verseveld *et al.*, 1991). Aufgrund dieser Tatsache wurde die Aufstellung des Fed-Batch-Verfahrens über $\mu_{\text{max}, \text{CO}_2}$ durchgeführt, da ein biomassenbasiertes μ_{max} unrealistische Werte ergeben hätte.

Der Verlauf des Fed-Batch-Verfahrens entsprach den theoretischen Verläufen (siehe Einleitung). Anders als erwartet kam es allerdings in den ersten Stunden nach Feedbeginn zunächst zu einer Übergangsphase. Möglich wäre eine Umstellung des pilzlichen Metabolismus auf langsameres Wachstum, wodurch es kurzfristig zum Einbruch in den XCO_2 -Werten kommt. In dieser Phase steigt der respiratorische Quotient von 1,0 auf 1,3 an. Für Glucose, welche der Pilz nach Spaltung von Maltose aufnimmt, entspricht der RQ-Wert einem Wert von 1,0 (Gallmetzer & Burgstaller, 2002; Righelato *et al.*, 1968). Der Anstieg auf einen RQ von 1,3 könnte an der Erschöpfung der Stickstoffquelle liegen, da bei der Kultivierung von *Penicillium simplicissimum* unter NH_4^+ -limitierenden Bedingungen ebenfalls ein RQ von 1,3 erreicht wurde (Gallmetzer & Burgstaller, 2002). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass auch das Komplexmedium weiter optimiert werden muss, indem der Stickstoffanteil erhöht wird. Nach der Übergangsphase setzt erneut exponentielles Wachstum mit einem prozentualen μ_{max} -Wert von 17 % ein, wodurch die angestrebten 20 % praktisch erreicht wurden. In dieser Phase kehrt der RQ zurück auf einen Wert von 1,0. Die im Feed enthaltene Menge an Stickstoffverbindungen ist daher ausreichend. Eine Steuerung der Wachstumsgeschwindigkeit scheint folglich bei *N. crassa* problemlos durchführbar zu sein.

In den ersten Stunden des Feedings konnte die produktbildende Phase verlängert werden, wodurch im Vergleich zur Batch-Phase zusätzliche 25 % des heterologen Proteins gebildet

wurden. Anschließend werden jedoch wieder Proteasen freigesetzt, die bei der Aufreinigung des Proteins zum vollständigen Abbau des Produktes führen. In zukünftigen Untersuchungen muss daher geklärt werden, was die Ursache für die Proteaseaktivität ist. Eine Möglichkeit ist, dass die zugefütterte Menge an Substrat zu gering ist, wodurch ein Teil des Myzels erneut dereprimiert ist und Proteasen produziert und sekretiert (siehe Abschnitt 4.1). Durch die Identifizierung der sekretierten Protease und Deletion des entsprechenden Gens könnte die Proteaseproblematik im Fed-Batch-Verfahren gelöst werden. Eine weitere Möglichkeit wäre die Autolyse des Myzels aufgrund langer Kultivierungszeiten. Dieser Effekt wurde bereits bei anderen filamentösen Pilzen beschrieben (McIntyre *et al.*, 2001; McNeil *et al.*, 1998). Setzt die Autolyse aufgrund von einer zu niedrigen Wachstumsgeschwindigkeit ein, so könnte ein höher gewähltes μ_{set} dieses Problem beheben. Ist dies nicht der Fall, so muss die Feedingphase kurz sein, damit das Produkt aus dem Überstand isoliert werden kann, da in den ersten Stunden des Feedings kein Proteaseaktivität festgestellt wurde.

Das Aufreinigungsverfahren für das Fusionsprotein war erfolgreich, jedoch bietet ein Verlust von 82 % viel Raum für Optimierungen. Der höchste Verlust wurde während der Fällung der Proteine verzeichnet (73 %). Hierzu müsste eine Versuchsreihe durchgeführt werden, bei welcher Konzentration des Ammoniumsulfats das Produkt ausfällt. Bei der anschließenden Affinitätschromatographie sollte ein stringenteres Waschen zu einer höheren Reinheit des Produktes führen.

4.4 *N. crassa* als Produktionssystem für heterologe Proteine

Mit dieser Arbeit konnte dargestellt werden, dass sich *N. crassa* als Produktionssystem für heterologe Proteine eignet. Innerhalb von drei Jahren konnte ein Produktionsstamm erzeugt werden, der signifikante Mengen an Produkt produziert. Nach der Medien- und Prozessoptimierung wurden ca. 15 mg/L an Fusionsprotein hergestellt, was bei einem Anteil von 35 % am Gesamtmolekulargewicht des Proteins ca. 5 mg/L reinen scFv HT186-D11 ergibt. Das heterologe Protein Präprochymosin, welches ebenfalls in *N. crassa* produziert wurde, konnte mit einer maximalen Konzentration von 1,2 mg/L produziert werden (Nakano *et al.*, 1993). Bei anderen Proteinen wie Zeamatin (Rasmussen-Wilson *et al.*, 1997) oder RNase A (Allgaier *et al.*, 2010) konnten lediglich Konzentrationen auf $\mu\text{g/L}$ -Niveau erreicht werden. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die gewählten Strategien und Optimierungen richtig gewählt wurden. Obwohl die in dieser Arbeit erreichten Produktkonzentrationen bislang erzielte

Konzentrationen heterologer Proteine aus *N. crassa*-Produktionssystemen um ein Vielfaches übertreffen, so ist die Produktmenge jedoch gering, wenn sie mit den Mengen aus anderen Pilzen und Produktionsorganismen verglichen wird. In *A. niger* wurde ein scFv mit einer Konzentration von ca. 100 mg/L in einem vergleichbaren Maßstab produziert (Sotiriadis *et al.*, 2001). Fab-Moleküle wurden in *Trichoderma reesei* mit einem Titer von 150 mg/L hergestellt (Nyssönen *et al.*, 1993). Diese Beispiele weisen darauf hin, dass auch mit *N. crassa* ebenfalls höhere Produktmengen erzeugt werden könnten, wenn das Produktionssystem entsprechend optimiert wird.

Auch in der Hefe *P. pastoris* wurden wesentlich höhere Mengen an scFv mit 150 mg/L (Maeng *et al.*, 2012) und 300 mg/L (Khatri *et al.*, 2011) produziert. Die Produktion in *E. coli* unterscheidet sich stark mit Titern im unteren mg/L-Bereich bis zu ca. 1 g/L in optimierten Systemen (Frenzel *et al.*, 2013). Mit *B. megaterium*, welcher ebenfalls das Produkt sekretiert, wurden mit < 1 mg/L zum Teil geringere Mengen als bei *N. crassa* erreicht (Jordan *et al.*, 2007), zum Teil wurden vergleichbare Mengen produziert (Wu *et al.*, 1998). Säugetierzellen werden meist nicht für die Produktion von scFv sondern vollständigen IgG-Molekülen genutzt. Hier werden in der Industrie üblicherweise bis zu 12 g/L an IgG produziert (Frenzel *et al.*, 2013).

Diese Beispiele zeigen, dass *N. crassa* bereits zum jetzigen Zeitpunkt konkurrenzfähig gegenüber bakteriellen Systemen ist. In *B. megaterium* wurden ähnliche Titer erreicht, in *E. coli* zum Teil höhere Mengen. Bei der Produktion in *E. coli* müssen die Proteine jedoch noch aufwändig aus dem Cytoplasma oder Periplasma extrahiert werden, wodurch zusätzliche Kosten entstehen. Da *N. crassa* das Produkt jedoch sekretiert, entfällt dieser Extraktionsschritt. Alle Organismen, welche wesentlich höhere Produktmengen erzeugen, werden jedoch schon seit längerer Zeit für die Produktion heterologer Proteine eingesetzt, weswegen sie bereits stark optimierte Systeme darstellen. Industriestämme wurden über Jahrzehnte optimiert, indem z. B. mehrere Zufallsmutagenesen durchgeführt wurden.

Bislang konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden, dass das von *N. crassa* sekretierte Produkt zu einem Großteil aktiv ist. Der hierfür vermutete Grund liegt im Aufbau des Fusionsproteins, welches aus der katalytischen Domäne von GLA-1 und dem O-glykosylierten Linker gefolgt vom scFv besteht. Der Carrier ist daher an den N-Terminus des scFv fusioniert. Nach der korrekten Faltung befindet sich jedoch am N-Terminus die Antigenbindungsstelle (Huang *et al.*, 2013; Petersson *et al.*, 2014). Der Carrier behindert daher wahrscheinlich sterisch die Antigenbindungsstelle, wodurch der scFv nicht ungehindert an sein Antigen binden kann. Bestätigt wird diese Theorie durch den Aktivitätsvergleich der Elutionsfraktionen nach

Kultivierung im parallelen Laborreaktorsystem. Hierbei beinhaltet die Elutionsfraktion mit höchster Aktivität als einzige Fraktion ein ca. 30 kD Protein, bei welchem vermutet wird, dass es sich um den freien scFv handelt. Dieser erfährt keine sterische Hinderung mehr und kann daher im ELISA an sein Antigen binden. Es gibt zwei Möglichkeiten, um diese Theorien zu bestätigen. Bei der ersten Möglichkeit könnte die Reihenfolge im Fusionsprotein abgeändert werden, sodass der *Carrier* an den C-Terminus des scFv gebunden wäre. Da allerdings über die Signalsequenz, welche für die Sekretion notwendig ist und daher weiterhin N-terminal angebracht sein muss, keine Informationen vorliegen, beinhaltet diese Variante weitere Risiken. Die zweite und wesentlich einfachere Möglichkeit ist die Einführung einer KEX2-Proteaseschnittstelle (Rasmussen-Wilson *et al.*, 1997). Die KEX2-ähnliche Protease befindet sich im Golgi-Apparat und würde noch während des Sekretionsvorganges den scFv vom *Carrier* abspalten (Gouka *et al.*, 1997; Jalving *et al.*, 2000; Redding *et al.*, 1991). Im Produktionsstamm DHN-270 ist das entsprechende Proteasegen *spr-3* nicht deletiert, wodurch diese Variante auf einfache Art und Weise getestet werden kann.

Trotz erfolgreicher Einführung des *N. crassa*-Expressionssystems bleiben einige Nachteile und ungelöste Probleme. Die Fed-Batch-Kultivierung hat aufgezeigt, dass der verwendete Produktionsstamm weiterhin unter bestimmten Bedingungen Proteasen freisetzt. Es muss diesbezüglich geklärt werden, ob es sich um sekretierte oder intrazelluläre Proteasen handelt, welche durch Lyse freigesetzt wurden. Dies könnte über die Detektion von Proteinen im Überstand geschehen, welche lediglich intrazellulär vorkommen (Xiong *et al.*, 2014). Ein weiterer Nachteil ist weiterhin das ungeklärte Assoziationsverhalten des *Carrier*-Proteins an die Zellwand. Ein großer Nachteil ist bislang der Mangel an Literatur, da nur wenige Forschungsgruppen *N. crassa* für biotechnologische Zwecke nutzen. Informationen müssen daher meist über andere filamentösen Pilzen wie *A. niger* und *T. reesei* erhalten werden. Bislang ist es noch nicht gelungen, die Sekretionskapazität des Pilzes von der Produktion endogener Proteine auf die von heterologen Proteinen zu übertragen. Hierfür werden folglich Untersuchungen benötigt, welche sich mit dem Weg vom Gen über die Transkription und Translation zum Protein sowie dem Sekretionsweg beschäftigen. Dadurch könnte der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Proteinproduktion identifiziert und optimiert werden.

Ein Aspekt, weswegen *N. crassa* und andere Pilze nicht für Produktion pharmazeutischer Proteine eingesetzt werden können, ist das von der menschlichen Zellen abweichende Glykosylierungsmuster (Gerngross, 2004; Nevalainen & Peterson, 2014). Im Falle der Hefe *P. pastoris* wurden jedoch bereits Versuche unternommen, den Glykosylierungsapparat an den

von humanen Zellen anzupassen (Bretthauer, 2003; Jacobs *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2006; Potgieter *et al.*, 2009).

Bei einer genaueren Betrachtung des Expressionssystems *N. crassa* überwiegen jedoch die Vorteile. Aufgrund seiner Rolle als Modellorganismus ist das Genom sequenziert und annotiert (Borkovich *et al.*, 2004; Galagan *et al.*, 2003). Gene können auf einfache Art und Weise deletiert werden, wodurch eine Ausschaltbibliothek für einen Großteil der Gene erzeugt werden konnte (Colot *et al.*, 2006). Die Stammkonstruktion wird durch diese Bibliothek und den sexuellen Lebenszyklus vereinfacht, wodurch sich diese Deletionen durch Kreuzung kombinieren lassen. Der Weg der Stammkonstruktion bei bereits einsatzbarem Transformationsstamm dauert nur wenige Wochen. Die für die Transformation eingesetzte DNA kann an vorher festgelegten Genorten stabil integriert werden, wodurch reproduzierbare Produktionsstämme erzeugt werden können. Dies ist ein großer Vorteil gegenüber tierischen Zellkulturen, bei denen eine Zelllinienkonstruktion bis zu 12 Monaten dauern kann und die Integration an zufälligen Loci stattfindet (Lai *et al.*, 2013). Ein weiterer Vorteil gegenüber tierischen Zellen ist die fehlende Kontamination durch tierische bzw. menschliche Viren (Adamson, 1998).

N. crassa kann problemlos und reproduzierbar in Rührreaktoren kultiviert werden und ermöglicht daher die Möglichkeit, große Kulturvolumina zu erzeugen. Da Kulturen mit Sporen angeimpft werden, können Großkulturen bereits nach einer Vorbereitungszeit von ca. einer Woche ohne Zwischenstufen durchgeführt werden. Das Wachstum von *N. crassa* ist im Vergleich zu anderen Pilzen sehr schnell, da C-Quellen mit einer Konzentration von 20 g/L bereits nach 20 h verbraucht sind. Das Medium ist im Vergleich zu Zellkulturen hinsichtlich der Kosten ca. um den Faktor 50 geringer. Dadurch besitzt *N. crassa* viele Vorteile, die vergleichbar mit bakteriellen und Hefekulturen sind. Somit vereint *N. crassa* sowohl die Vorteile von tierischen bzw. menschlichen Zellkulturen, indem Proteine in das Medium sekretiert werden können, nachdem sie eine posttranslationale Modifikation erfahren haben, und die Vorteile von bakteriellen und Hefekulturen durch ihre einfache Handhabbarkeit.

4.5 Ausblick

Obwohl filamentöse Pilze endogene Proteine im g/L-Maßstab sekretieren können, lässt sich diese Produktionskapazität bislang nicht auf die Herstellung heterologer Proteine übertragen (Nevalainen & Peterson, 2014). Die entscheidenden Schritte bei der Optimierung dieses

Expressionssystemen sind daher die Ursachenfindung für diese Limitierung. Da nur geringe Produktmengen trotz hoher mRNA-Konzentrationen erreicht werden, wurde vorgeschlagen, dass die eigentliche Limitierung auf der posttranskriptionalen Ebene, insbesondere dem Sekretionsweg, zu finden sein könnte (Gordon *et al.*, 2000a).

Basierend auf dieser Arbeit kann das Produktionssystem durch kurzfristige Veränderungen optimiert werden. Ein grundlegendes Problem dieses Systems war bislang die geringe Aktivität des Fusionsproteins. Die Einführung einer KEX2-Proteaseschnittstelle würde wahrscheinlich dieses Problem beheben, da eine sterische Hinderung des scFv durch den *Carrier* vermutet wurde. Dies würde auch gleichzeitig eine eventuelle Assoziation des Produktes an die Zellwand umgehen, da der scFv zum einen wesentlich kleiner ist als das gesamte Fusionsprotein, zum anderen wäre die Bindung des *Carriers* an die Zellwand nicht mehr hinderlich für die Freisetzung des scFv.

Weitere Optimierungen des *Carriers* könnten ebenfalls die Ausbeute erhöhen. Eine Verkürzung des *Carriers* auf die nötigsten Elemente (Präpro-Peptid) würde die Größe des Fusionsproteins verringern. Es wird jedoch empfohlen, das Intron der Glucoamylase beizubehalten, da fehlende Introns zum Ausbleiben der Produktion führen können (Su *et al.*, 2012). Alternativ könnten auch Signalpeptide anderer Pilze verwendet werden (Allgaier *et al.*, 2010).

Um die hohen Mengen an sekretierter Glucoamylase auszunutzen, könnte erneut auf den Glucoamylase-Promotor zurückgegriffen werden. Dieser führte zwar bislang zu geringen Ausbeuten, dies könnte jedoch an falsch gewählten Kultivierungsbedingungen gelegen haben, da *Pgla* erst unter C-Quellen-Limitierung und einer daraus folgenden Derepression zur höchsten Produktmenge führt (Koh-Luar *et al.*, 1989). Für *N. crassa* wurde die Mutante *agr-1* beschrieben, bei welcher GLA-1 konstitutiv produziert wurde (Sigmund *et al.*, 1985). In der *exo-1*-Mutante wird in der Derepressionsphase die Glucoamylase um ein Vielfaches stärker sekretiert als im Wildtyp (Gratzner & Sheehan, 1969). Eine Kombination beider Mutationen in einem Produktionsstamm, in welchem das heterologe Gen durch den Glucoamylase-Promotor gesteuert wird, könnte zu einem synergetischen Effekt führen. Da der produktsteigernde Mechanismus beider Mutationen nicht bekannt ist, würde es sich empfehlen, das heterologe Gen direkt am nativen Locus der Glucoamylase zu integrieren. Der Grund hierfür ist, dass auch eine epigenetische Regulation des Locus durch Eu- und Heterochromatin die Menge der gebildeten Glucoamylase beeinflussen könnte. Möchte man auf dieses Enzym jedoch nicht verzichten, so könnte das native *gla-1*-Gen gleichzeitig am *his-3*-Locus integriert

werden, um das Wachstum sowie die Produktion auf Maltose oder Stärke weiterhin zu ermöglichen.

Kultivierungen in Bioreaktoren haben gezeigt, dass weiterhin Proteasen in bestimmten Phasen freigesetzt werden. Die Ausschaltung weiterer Proteasegene (siehe Abschnitt 4.1) könnte die Proteaseaktivität weiter verringern. Der Fed-Batch-Prozess bedarf weiterer Untersuchungen bezüglich der optimalen Feedingrate und somit optimalen spezifischen Wachstumsrate. Die Verwendung des Komplexmediums hat die spezifische Wachstumsrate stark erhöht. Falls weiterhin ein definiertes Medium gewünscht ist, sollte dieses um eine Mischung ausgewählter Aminosäuren ergänzt werden, da diese das Wachstum positiv beeinflussen können (Alberghina, 1973). Dies könnte gleichzeitig die Sekretion einiger Proteasen unterdrücken (Cohen & Drucker, 1977; Drucker, 1972).

Neben diesen kurzfristigen Verbesserungen des Expressionssystems ist es erforderlich, den vollständigen Produktionsapparat für Proteine zu verstehen, um eine langfristige Optimierung des Systems zu erreichen. So ist bislang noch nicht geklärt, welche Rolle die mRNA in Bezug auf ihre Menge und ihre Stabilität spielt. Eine Möglichkeit für die geringen Produktmengen könnten zu hohe mRNA-Mengen sein, wodurch die Zelle überlastet wird. Auch zu geringe mRNA-Mengen könnten zu geringen Produktmengen führen. Daher sollten zunächst Quantifizierungen der mRNA-Menge bei verschiedenen Promotoren durchgeführt werden. Ein anderer Ansatz beschäftigt sich mit einer erhöhten Stabilität der mRNA, welche durch die beinhalteten Codons beeinflusst werden kann (Marin, 2008; Plotkin & Kudla, 2011). Durch eine Codonharmonisierung (Angov *et al.*, 2008) sowie der Verwendung verschiedener Terminatoren (Curran *et al.*, 2013, 2015) (Angov *et al.*, 2008) könnte die mRNA-Stabilität erhöht und somit mehr Produkt erzielt werden.

Parallel hierzu sollten Untersuchungen des Sekretionswegs durchgeführt werden. Häufig führt die Expression heterologer Proteine durch die Anhäufung ungefalteter Proteine zu ER-Stress, wodurch die *unfolded protein response* (UPR) eingeleitet wird (Heimel, 2015). Ob es bei der Produktion des heterologen Produktes zu ER-Stress und folglich sogar zu ER-assoziiertem Proteinabbau (ERAD) kommt, müsste folglich untersucht werden (Carvalho *et al.*, 2011). UPR und ERAD sind komplex reguliert, wodurch Veränderungen auf dieser Ebene sehr produktspezifisch sind und diese Herangehensweise für jedes Produkt separat überprüft werden muss (Nevalainen & Peterson, 2014). Ansätze hierfür sind die konstitutive Induktion UPR-zugehöriger Gene, wodurch sich der Organismus auf die erhöhte Produktion von Proteinen einstellt (Valkonen *et al.*, 2003). Auch die Überexpression einiger Chaperone und Foldasen hat

zwar in einigen Fällen zur Erhöhung der Produktausbeute geführt, häufig ist dieser einfache Zusammenhang jedoch nicht gegeben (Nevalainen & Peterson, 2014; Ward, 2012). Hingegen führte die Deletion einiger ERAD-Gene zu höheren Produktausbeuten bei *A. niger* und könnte folglich auch bei *N. crassa* angewendet werden (Carvalho *et al.*, 2011). In *A. oryzae* konnte durch die Deletion eines vakuolaren Rezeptors ebenfalls die Produktausbeute von heterologem Protein erhöht werden, da der Proteinabbau über Vakuolen vermindert wurde (Yoon *et al.*, 2010).

Durch die Kombination dieser vorgeschlagenen Optimierungen könnte das *N. crassa*-Produktionssystem weiter verbessert werden, um Proteinmengen in Bereichen zu produzieren, welche bereits bei optimierten Pilzen wie *A. niger* und *T. reesei* oder Hefen wie *P. pastoris* erreicht wurden.

5 Literaturverzeichnis

- Abbott, R. J. & Marzluf, G. A. (1984). Major extracellular protease of *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* **159**, 505–10.
- Adamson, S. R. (1998). Experiences of virus, retrovirus and retrovirus-like particles in Chinese hamster ovary (CHO) and hybridoma cells used for production of protein therapeutics. *Dev Biol Stand* **93**, 89–96.
- Alberghina, F. a M. (1973). Growth regulation in *Neurospora crassa* effects of nutrients and of temperature. *Arch Mikrobiol* **89**, 83–94.
- Allert, M., Cox, J. C. & Hellinga, H. W. (2010). Multifactorial determinants of protein expression in prokaryotic open reading frames. *J Mol Biol* **402**, 905–18.
- Allgaier, S., Taylor, R. D., Brudnaya, Y., Jacobson, D. J., Cambareri, E. & Stuart, W. D. (2009). Vaccine production in *Neurospora crassa*. *Biologicals* **37**, 128–32. Elsevier Ltd.
- Allgaier, S., Weiland, N., Hamad, I. & Kempken, F. (2010). Expression of ribonuclease A and ribonuclease N1 in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Appl Microbiol Biotechnol* **85**, 1041–9.
- Alves, S. (2006, November 9). *Entwicklung eines Expressionssystems zur Produktion therapeutischer Proteine in filamentösen Hyphenpilzen*. Universitätsbibliothek Kiel.
- Andersen, K. B. & Von Meyenburg, K. (1980). Are growth rates of *Escherichia coli* in batch cultures limited by respiration? *J Bacteriol* **144**, 114–123.
- Angov, E. (2011). Codon usage: Nature's roadmap to expression and folding of proteins. *Biotechnol J* **6**, 650–659.
- Angov, E., Hillier, C. J., Kincaid, R. L. & Lyon, J. A. (2008). Heterologous protein expression is enhanced by harmonizing the codon usage frequencies of the target gene with those of the expression host. *PLoS One* **3**, e2189.
- Aramayo, R. & Metzenberg, R. (1996). Gene replacements at the his-3 locus of *Neurospora crassa*. *Fungal ...*
- Archer, D. B. & Peberdy, J. F. (1997). The molecular biology of secreted enzyme production by fungi. *Crit Rev Biotechnol* **17**, 273–306.
- Archer, D. B., Jeenes, D. J. & Mackenzie, D. a. (1994). Strategies for improving heterologous protein production from filamentous fungi. *Antonie Van Leeuwenhoek* **65**, 245–250.
- Avalos, J., Geever, R. F. & Case, M. E. (1989). Bialaphos resistance as a dominant selectable marker in *Neurospora crassa*. *Curr Genet* **16**, 369–72.
- Backliwal, G., Hildinger, M., Chenuet, S., Wulhfard, S., De Jesus, M. & Wurm, F. M. (2008). Rational vector design and multi-pathway modulation of HEK 293E cells yield recombinant antibody titers exceeding 1 g/l by transient transfection under serum-free conditions. *Nucleic Acids Res* **36**, e96.
- Bartnicki-Garcia, S. (1968). Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Annu Rev Microbiol* **22**, 87–108.
- Bartnicki-Garcia, S. & Lippman, E. (1969). Fungal morphogenesis: cell wall construction in *Mucor rouxii*. *Science* **165**, 302–4.
- Beadle, G. & Tatum, E. (1941). Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*. *Proc Natl Acad ...* **27**.
- Bergmeyer, H. U., Gawehn, K. & Grassl, M. (1974). *Methods of Enzymatic Analysis. Methods Enzym Anal*, Volume I., (H. U. Bergmeyer, Ed.). Academic Press, Inc., New York, NY.
- Berlec, A. & Štrukelj, B. (2013). Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. *J Ind Microbiol Biotechnol* **40**, 257–274.
- Bernfeld, P. (1955). Amylases, α and β . *Methods Enzymol* **1**, 149–158.
- BIOPHARMA. (2015). Biopharmaceutical Products in the U.S. and European Markets - Recent U.S. Approvals.
- Bird, R. E., Hardman, K. D., Jacobson, J. W., Johnson, S., Kaufman, B. M., Lee, S. M., Lee, T., Pope, S. H., Riordan, G. S. & Whitlow, M. (1988). Single-chain antigen-binding proteins. *Science* **242**, 423–6.
- Blazek, D. & Celer, V. (2003). The production and application of single-chain antibody fragments. *Folia Microbiol (Praha)* **48**, 687–98.
- Borkovich, K. A., Alex, L. A., Yarden, O., Freitag, M., Turner, G. E., Read, N. D., Seiler, S., Bell-Pedersen, D., Paietta, J. & other authors. (2004). Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 1–108.
- Bothmann, H. & Pluckthun, A. (2000). The periplasmic *Escherichia coli* peptidylprolyl cis,trans-isomerase FkpA. I. Increased functional expression of antibody fragments with and without cis-prolines. *J Biol Chem* **275**, 17100–5.
- Braaksma, M., Martens-Uzunova, E. S., Punt, P. J. & Schaap, P. J. (2010). An inventory of the *Aspergillus niger* secretome by combining in silico predictions with shotgun proteomics data. *BMC Genomics* **11**, 584. BioMed Central Ltd.

- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–54.
- Bretthauer, R. K. (2003).** Genetic engineering of *Pichia pastoris* to humanize N-glycosylation of proteins. *Trends Biotechnol* **21**, 459–62.
- Van den Brink, H. (J.) M., Petersen, S. G., Rahbek-Nielsen, H., Hellmuth, K. & Harboe, M. (2006).** Increased production of chymosin by glycosylation. *J Biotechnol* **125**, 304–310.
- Broekhuijsen, M., Mattern, I., Contreras, R., Kinghorn, J. R. & van den Hondel, C. A. M. J. J. (1993).** Secretion of heterologous proteins by *Aspergillus niger*: Production of active human interleukin-6 in a protease-deficient mutant by KEX2-like processing of a glucoamylase-hIL6 fusion protein. *J Biotechnol* **31**, 135–145.
- Van Brunt, J. (1986).** Fungi: the perfect hosts? *Nat Biotechnol* **4**, 1057–1062.
- Bull, A. T. & Trinci, A. P. (1977).** The physiology and metabolic control of fungal growth. *Adv Microb Physiol* **15**, 1–84.
- Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W. & Keller, N. P. (2002).** Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 447–59, table of contents.
- Carlsen, M., Spohr, A. B., Nielsen, J. & Villadsen, J. (1996).** Morphology and physiology of an α -amylase producing strain of *Aspergillus oryzae* during batch cultivations. *Biotechnol Bioeng* **49**, 266–276.
- Carvalho, N. D. S. P., Arentshorst, M., Kooistra, R., Stam, H., Sagt, C. M., van den Hondel, C. A. M. J. J. & Ram, A. F. J. (2011).** Effects of a defective ERAD pathway on growth and heterologous protein production in *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol* **89**, 357–73.
- Cervantes, F. J., Pavlostathis, S. G. & van Haandel, A. C. (2006).** *Advanced Biological Treatment Processes for Industrial Wastewaters: Principles and Applications*. Integrated environmental technology series. IWA Publishing.
- Chang, P. L. Y. & Trevithick, J. R. (1972).** Release of Wall-bound Invertase and Trehalase in *Neurospora crassa* by Hydrolytic Enzymes. *J Gen Microbiol* **70**, 13–22.
- Chen, C., Snedecor, B., Nishihara, J. C., Joly, J. C., McFarland, N., Andersen, D. C., Battersby, J. E. & Champion, K. M. (2004).** High-level accumulation of a recombinant antibody fragment in the periplasm of *Escherichia coli* requires a triple-mutant (degP prc spr) host strain. *Biotechnol Bioeng* **85**, 463–74.
- Chen, X., Zaro, J. L. & Shen, W.-C. (2013).** Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Adv Drug Deliv Rev* **65**, 1357–69. Elsevier B.V.
- Cherry, J. R. & Fidantsef, A. L. (2003).** Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Curr Opin Biotechnol* **14**, 438–43.
- Chmiel, H. (2005).** *Bioprozesstechnik*, 2. Auflage. Springer Berlin Heidelberg.
- Choi, B.-K., Bobrowicz, P., Davidson, R. C., Hamilton, S. R., Kung, D. H., Li, H., Miele, R. G., Nett, J. H., Wildt, S. & Gerngross, T. U. (2003).** Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast *Pichia pastoris*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5022–7.
- Cohen, B. L. & Drucker, H. (1977).** Regulation of exocellular protease in *Neurospora crassa*: Induction and repression under conditions of nitrogen starvation. *Arch Biochem Biophys* **182**, 601–613.
- Cohen, B. L., Morris, J. E. & Drucker, H. (1975).** Regulation of two extracellular proteases of *Neurospora crassa* by induction and by carbon-nitrogen and sulfur-metabolite repression. *Arch Biochem Biophys* **169**, 324–330.
- Collins, M. E., Briggs, G., Sawyer, C. & Sheffield, P. (1991).** An inducible gene expression system for *Neurospora crassa*. *Enzym Microb Technol* **13**, 400–403.
- Colot, H. V, Park, G., Turner, G. E., Ringelberg, C., Crew, C. M., Litvinkova, L., Weiss, R. L., Borkovich, K. A. & Dunlap, J. C. (2006).** A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 10352–7.
- Conesa, A., Punt, P. J., van Luijk, N. & van den Hondel, C. A. (2001).** The secretion pathway in filamentous fungi: a biotechnological view. *Fungal Genet Biol* **33**, 155–71.
- Coutinho, P. M. & Reilly, P. J. (1994).** Structure-function relationships in the catalytic and starch binding domains of glucoamylase. *Protein Eng* **7**, 393–400.
- Curran, K. A., Morse, N. J., Markham, K. A., Wagman, A. M., Gupta, A. & Alper, H. S. (2015).** Short Synthetic Terminators for Improved Heterologous Gene Expression in Yeast. *ACS Synth Biol*.
- Curran, K. A., Karim, A. S., Gupta, A. & Alper, H. S. (2013).** Use of expression-enhancing terminators in *Saccharomyces cerevisiae* to increase mRNA half-life and improve gene expression control for metabolic engineering applications. *Metab Eng* **19**, 88–97.
- Damasceno, L. M., Pla, I., Chang, H.-J., Cohen, L., Ritter, G., Old, L. J. & Batt, C. A. (2004).** An optimized fermentation process for high-level production of a single-chain Fv antibody fragment in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* **37**, 18–26.
- Daniell, H., Streatfield, S. J. & Wycoff, K. (2001).** Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci* **6**, 219–226.

- Davis, R. & Serres, F. de. (1970).** Genetic and microbiological research techniques for *Neurospora crassa*. *Methods Enzymol.*
- Davis, R. H. & Perkins, D. D. (2002).** Timeline: *Neurospora*: a model of model microbes. *Nat Rev Genet* **3**, 397–403.
- Davis, R. H. (2000).** *Neurospora : Contributions of a Model Organism*. New York: Oxford University Press.
- Demain, A. L. & Vaishnav, P. (2009).** Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv* **27**, 297–306. Elsevier Inc.
- Dementhon, K., Iyer, G. & Glass, N. L. (2006).** VIB-1 is required for expression of genes necessary for programmed cell death in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* **5**, 2161–73.
- Denison, S. H. (2000).** pH regulation of gene expression in fungi. *Fungal Genet Biol* **29**, 61–71.
- Deshpande, N., Wilkins, M. R., Packer, N. & Nevalainen, H. (2008).** Protein glycosylation pathways in filamentous fungi. *Glycobiology* **18**, 626–37.
- Drucker, H. (1972).** Regulation of exocellular proteases in *Neurospora crassa*: induction and repression of enzyme synthesis. *J Bacteriol* **110**, 1041–9.
- Dunn-Coleman, N. S., Bloebaum, P., Berka, R. M., Bodie, E., Robinson, N., Armstrong, G., Ward, M., Przetak, M., Carter, G. L. & other authors. (1991).** Commercial levels of chymosin production by *Aspergillus*. *Biotechnology (N Y)* **9**, 976–981. Nature Publishing Company.
- Edelmann, S. E. & Staben, C. (1994).** A Statistical Analysis of Sequence Features within Genes from *Neurospora crassa*. *Exp Mycol.*
- Eldin, P., Pauza, M. E., Hieda, Y., Lin, G., Murtaugh, M. P., Pentel, P. R. & Pennell, C. A. (1997).** High-level secretion of two antibody single chain Fv fragments by *Pichia pastoris*. *J Immunol Methods* **201**, 67–75.
- Emberson, L. M., Trivett, A. J., Blower, P. J. & Nicholls, P. J. (2005).** Expression of an anti-CD33 single-chain antibody by *Pichia pastoris*. *J Immunol Methods* **305**, 135–51.
- Fischer, B., Sumner, I. & Goodenough, P. (1993).** Isolation, renaturation, and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biotechnol Bioeng* **41**, 3–13.
- Fleissner, A. & Dersch, P. (2010).** Expression and export: recombinant protein production systems for *Aspergillus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**, 1255–70.
- Fleissner, A., Simonin, A. R. & Glass, N. L. (2008).** Cell fusion in the filamentous fungus, *Neurospora crassa*. *Methods Mol Biol* **475**, 21–38.
- Flynn, G. C., Pohl, J., Flocco, M. T. & Rothman, J. E. (1991).** Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. *Nature* **353**, 726–730.
- Fournier, P. & Schirrmacher, V. (2012).** Bispecific Antibodies and Trispecific Immunocytokines for Targeting the Immune System Against Cancer. *BioDrugs* **27**, 35–53.
- Frenken, L. G. J. G., Hessing, J. G. M. G., Van den Hondel, C. A. M. J. J. A. & Verrips, C. T. T. (1998).** Recent advances in the large-scale production of antibody fragments using lower eukaryotic microorganisms. *Res Immunol* **149**, 589–99.
- Frenzel, A., Hust, M. & Schirrmann, T. (2013).** Expression of recombinant antibodies. *Front Immunol* **4**, 217.
- Galagan, J. E., Calvo, S. E., Borkovich, K. A., Selker, E. U., Read, N. D., Jaffe, D., FitzHugh, W., Ma, L.-J., Smirnov, S. & other authors. (2003).** The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature* **422**, 859–68.
- Gallmetzer, M. & Burgstaller, W. (2002).** Efflux of organic acids in *Penicillium simplicissimum* is an energy-spilling process, adjusting the catabolic carbon flow to the nutrient supply and the activity of catabolic pathways. *Microbiology* **148**, 1143–1149.
- Ganzlin, M. & Rinas, U. (2008).** In-depth analysis of the *Aspergillus niger* glucoamylase (glaA) promoter performance using high-throughput screening and controlled bioreactor cultivation techniques. *J Biotechnol* **135**, 266–71.
- Gao, D., Wang, S., Li, H., Yu, H. & Qi, Q. (2015).** Identification of a heterologous cellulase and its N-terminus that can guide recombinant proteins out of *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* **14**, 49.
- Gasser, B., Maurer, M., Gach, J., Kunert, R. & Mattanovich, D. (2006).** Engineering of *Pichia pastoris* for improved production of antibody fragments. *Biotechnol Bioeng* **94**, 353–61.
- Gerngross, T. U. (2004).** Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nat Biotechnol* **22**, 1409–14.
- Geysens, S., Whyteside, G. & Archer, D. B. (2009).** Genomics of protein folding in the endoplasmic reticulum, secretion stress and glycosylation in the aspergilli. *Fungal Genet Biol* **46**, S121–S140.
- Glass, N. L. & Kaneko, I. (2003).** Fatal attraction: nonself recognition and heterokaryon incompatibility in filamentous fungi. *Eukaryot Cell* **2**, 1–8.
- Gnoth, S., Jenzsch, M., Simutis, R. & Lübbert, A. (2008).** Control of cultivation processes for recombinant protein production: A review. *Bioprocess Biosyst Eng* **31**, 21–39.

- Gooch, V. D., Mehra, A., Larrondo, L. F., Fox, J., Touroutoudis, M., Loros, J. J. & Dunlap, J. C. (2008). Fully codon-optimized luciferase uncovers novel temperature characteristics of the *Neurospora* clock. *Eukaryot Cell* **7**, 28–37.
- Gordon, C. L., Khalaj, V., Ram, A. F., Archer, D. B., Brookman, J. L., Trinci, A. P., Jeenes, D. J., Doonan, J. H., Wells, B. & other authors. (2000a). Glucoamylase::green fluorescent protein fusions to monitor protein secretion in *Aspergillus niger*. *Microbiology* **146** (Pt 2), 415–26.
- Gordon, C. L., Archer, D. B., Jeenes, D. J., Doonan, J. H., Wells, B., Trinci, A. P. & Robson, G. D. (2000b). A glucoamylase::GFP gene fusion to study protein secretion by individual hyphae of *Aspergillus niger*. *J Microbiol Methods* **42**, 39–48.
- Goudar, C. T. & Strevett, K. A. (1998). Estimating growth kinetics of *Penicillium chrysogenum* by nonlinear regression. *Biochem Eng J* **1**, 191–199.
- Gouka, R. J., Punt, P. J. & van den Hondel, C. A. (1997). Glucoamylase gene fusions alleviate limitations for protein production in *Aspergillus awamori* at the transcriptional and (post) translational levels. *Appl Environ Microbiol* **63**, 488–97.
- Gratzner, H. & Sheehan, D. N. (1969). *Neurospora* mutant exhibiting hyperproduction of amylase and invertase. *J Bacteriol* **97**, 544–9.
- Gratzner, H. G. (1972). Cell wall alterations associated with the hyperproduction of extracellular enzymes in *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* **111**, 443–6.
- Gu, W., Zhou, T. & Wilke, C. O. (2010). A universal trend of reduced mRNA stability near the translation-initiation site in prokaryotes and eukaryotes. *PLoS Comput Biol* **6**, e1000664.
- Guo, Z., Qiu, C., Zhang, L., Ding, Z., Wang, Z.-X. & Shi, G.-Y. (2011). Expression of aspartic protease from *Neurospora crassa* in industrial ethanol-producing yeast and its application in ethanol production. *Enzyme Microb Technol* **48**, 148–54.
- Gurkan, C., Symeonides, S. N. & Ellar, D. J. (2004). High-level production in *Pichia pastoris* of an anti-p185HER-2 single-chain antibody fragment using an alternative secretion expression vector. *Biotechnol Appl Biochem* **39**, 115–22.
- Hanson, M. A. & Marzluf, G. A. (1973). Regulation of a sulfur-controlled protease in *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* **116**, 785–9.
- Hayakawa, Y., Ishikawa, E., Shoji, J.-Y., Nakano, H. & Kitamoto, K. (2011). Septum-directed secretion in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Mol Microbiol* **81**, 40–55.
- Heimel, K. (2015). Unfolded protein response in filamentous fungi-implications in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**, 121–32.
- Helenius, A. & Aebi, M. (2004). Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* **73**, 1019–49.
- Higashitsuji, Y., Herrero, S., Takeshita, N. & Fischer, R. (2009). The cell end marker protein TeaC is involved in growth directionality and septation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **8**, 957–67.
- Van den Hombergh, J. P. T., van de Vondervoort, P. J., Fraissinet-Tachet, L. & Visser, J. (1997). *Aspergillus* as a host for heterologous protein production: the problem of proteases. *Trends Biotechnol* **15**, 256–263.
- Honda, S. & Selker, E. U. (2009). Tools for fungal proteomics: multifunctional *neurospora* vectors for gene replacement, protein expression and protein purification. *Genetics* **182**, 11–23.
- Hsu, T. A., Takahashi, N., Tsukamoto, Y., Kato, K., Shimada, I., Masuda, K., Whiteley, E. M., Fan, J. Q., Lee, Y. C. & Betenbaugh, M. J. (1997). Differential N-glycan patterns of secreted and intracellular IgG produced in *Trichoplusia ni* cells. *J Biol Chem* **272**, 9062–70.
- Hu, G. & St. Leger, R. J. (2004). A phylogenomic approach to reconstructing the diversification of serine proteases in fungi. *J Evol Biol* **17**, 1204–1214.
- Hu, S., Shively, L., Raubitschek, A., Sherman, M., Williams, L. E., Wong, J. Y., Shively, J. E. & Wu, A. M. (1996). Minibody: A novel engineered anti-carcinoembryonic antigen antibody fragment (single-chain Fv-CH3) which exhibits rapid, high-level targeting of xenografts. *Cancer Res* **56**, 3055–61.
- Huang, L., Su, X. & Federoff, H. J. (2013). Single-chain fragment variable passive immunotherapies for neurodegenerative diseases. *Int J Mol Sci* **14**, 19109–27. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- Hunsley, D. & Burnett, J. H. (1970). The Ultrastructural Architecture of the Walls of Some Hyphal Fungi. *J Gen Microbiol* **62**, 203–218.
- Hurley, J., Loros, J. J. & Dunlap, J. C. (2015). *Circadian Rhythms and Biological Clocks, Part A. Methods Enzymol*, Methods in Enzymology. Elsevier.
- Hurley, J. M., Chen, C., Loros, J. J. & Dunlap, J. C. (2012). Light-inducible system for tunable protein expression in *Neurospora crassa*. *G3 (Bethesda)* **2**, 1207–12.
- Hust, M., Jostock, T., Menzel, C., Voedisch, B., Mohr, A., Brenneis, M., Kirsch, M. I., Meier, D. & Dübel, S. (2007). Single chain Fab (scFab) fragment. *BMC Biotechnol* **7**, 14.

- Hutter, H. & Schnabel, R. (1994). glp-1 and inductions establishing embryonic axes in *C. elegans*. *Development* **120**, 2051–64.
- Ichi-ishi, A. & Inoue, H. (1995). Cloning, nucleotide sequence, and expression of tef-1, the gene encoding translation elongation factor 1 alpha (EF-1 alpha) of *Neurospora crassa*. *Jpn J Genet* **70**, 273–87.
- Inoue, Y., Ohta, T., Tada, H., Iwasa, S., Udaka, S. & Yamagata, H. (1997). Efficient production of a functional mouse/human chimeric Fab' against human urokinase-type plasminogen activator by *Bacillus brevis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **48**, 487–492.
- Jacobs, P. P., Geysens, S., Vervecken, W., Contreras, R. & Callewaert, N. (2009). Engineering complex-type N-glycosylation in *Pichia pastoris* using GlycoSwitch technology. *Nat Protoc* **4**, 58–70.
- Jacobson, D. J., Dettman, J. R., Adams, R. I., Boesl, C., Sultana, S., Roenneberg, T., Merrow, M., Duarte, M., Marques, I. & other authors. (2006). New findings of *Neurospora* in Europe and comparisons of diversity in temperate climates on continental scales. *Mycologia* **98**, 550–559.
- Jalving, R., van de Vondervoort, P. J., Visser, J. & Schaap, P. J. (2000). Characterization of the kexin-like maturase of *Aspergillus niger*. *Appl Environ Microbiol* **66**, 363–8.
- Janeway, C. A. & Travers, P. (2002). *Immunologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Jeenes, D. J., Marczinke, B., MacKenzie, D. A. & Archer, D. B. (1993). A truncated glucoamylase gene fusion for heterologous protein secretion from *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol Lett* **107**, 267–271. The Oxford University Press.
- Jones, D., Kroos, N., Anema, R., van Montfort, B., Vooys, A., van der Kraats, S., van der Helm, E., Smits, S., Schouten, J. & other authors. (2008). High-level expression of recombinant IgG in the human cell line per.c6. *Biotechnol Prog* **19**, 163–8.
- Joosten, V., Lokman, C., Van Den Hondel, C. A. & Punt, P. J. (2003). The production of antibody fragments and antibody fusion proteins by yeasts and filamentous fungi. *Microb Cell Fact* **2**, 1.
- Jordan, E., Al-Halabi, L., Schirrmann, T., Hust, M. & Dübel, S. (2007). Production of single chain Fab (scFab) fragments in *Bacillus megaterium*. *Microb Cell Fact* **6**, 38.
- Junker, B. (2009). Corrosion in bioprocessing applications. *Bioprocess Biosyst Eng* **32**, 1–29.
- Kallies, A., Mohsenzadeh, S. & Rensing, L. (1992). Effects of light on protein secretion in *Neurospora crassa*. *Arch Microbiol* **157**, 104–6. Springer-Verlag.
- Karimi, Z., Nezafat, N., Negahdaripour, M., Berenjian, A., Hemmati, S. & Ghasemi, Y. (2015). The effect of rare codons following the ATG start codon on expression of human granulocyte-colony stimulating factor in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **114**, 108–114.
- Keränen, S. & Penttilä, M. (1995). Production of recombinant proteins in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Curr Opin Biotechnol* **6**, 534–537.
- Khalaj, V., Brookman, J. L. & Robson, G. D. (2001). A study of the protein secretory pathway of *Aspergillus niger* using a glucoamylase-GFP fusion protein. *Fungal Genet Biol* **32**, 55–65.
- Khatri, N. K., Gocke, D., Trentmann, O., Neubauer, P. & Hoffmann, F. (2011). Single-chain antibody fragment production in *Pichia pastoris*: Benefits of prolonged pre-induction glycerol feeding. *Biotechnol J* **6**, 452–62.
- Kinnaird, J. H., Burns, P. A. & Fincham, J. R. (1991). An apparent rare-codon effect on the rate of translation of a *Neurospora* gene. *J Mol Biol* **221**, 733–6.
- Koda, A., Bogaki, T., Minetoki, T. & Hirotsume, M. (2005). High expression of a synthetic gene encoding potato alpha-glucan phosphorylase in *Aspergillus niger*. *J Biosci Bioeng* **100**, 531–7.
- Koh-Luar, S. I., Parish, J., Bleasby, A., Pappin, D. J. C., Ainley, K., Johansen, F.-E., McPherson, M. J. & Radfors, A. (1989). Exported proteins of *Neurospora crassa*: 1-glucoamylase. *Enzyme Microb Technol* **11**, 692–695.
- Kretzschmar, T., Aoustin, L., Zingel, O., Marangi, M., Vonach, B., Towbin, H. & Geiser, M. (1996). High-level expression in insect cells and purification of secreted monomeric single-chain Fv antibodies. *J Immunol Methods* **195**, 93–101.
- Kudla, G., Murray, A. W., Tollervey, D. & Plotkin, J. B. (2009). Coding-sequence determinants of gene expression in *Escherichia coli*. *Science* **324**, 255–8.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–5.
- Lai, T., Yang, Y. & Ng, S. K. (2013). Advances in Mammalian cell line development technologies for recombinant protein production. *Pharmaceuticals (Basel)* **6**, 579–603.
- Lamb, T. M., Vickery, J. & Bell-Pedersen, D. (2013). Regulation of gene expression in *Neurospora crassa* with a copper responsive promoter. *G3 (Bethesda)* **3**, 2273–80.
- Lee, I. H., Walline, R. G. & Plamann, M. (1998). Apolar growth of *Neurospora crassa* leads to increased secretion of extracellular proteins. *Mol Microbiol* **29**, 209–18.
- Lei, S. P., Lin, H. C., Wang, S. S., Callaway, J. & Wilcox, G. (1987). Characterization of the *Erwinia carotovora* pelB gene and its product pectate lyase. *J Bacteriol* **169**, 4379–83.

- Li, H., Sethuraman, N., Stadheim, T. A., Zha, D., Prinz, B., Ballew, N., Bobrowicz, P., Choi, B., Cook, W. J. & other authors. (2006). Optimization of humanized IgGs in glycoengineered *Pichia pastoris*. *Nat Biotechnol* **24**, 210–5.
- Liang, M., Dübel, S., Li, D., Queitsch, I., Li, W. & Bautz, E. K. . (2001). Baculovirus expression cassette vectors for rapid production of complete human IgG from phage display selected antibody fragments. *J Immunol Methods* **247**, 119–130.
- Liaud, N., Giniés, C., Navarro, D., Fabre, N., Crapart, S., Gimbert, I. H., Levasseur, A., Raouche, S. & Sigoillot, J.-C. (2014). Exploring fungal biodiversity: organic acid production by 66 strains of filamentous fungi. *Fungal Biol Biotechnol* **1**, 1. BioMed Central Ltd.
- Lichius, A. & Lord, K. M. (2014). Chemoattractive Mechanisms in Filamentous Fungi **43**, 28–57.
- Lindberg, R. A., Eirich, L. D., Price, J. S., Wolfenbarger, L. & Drucker, H. (1981). Alkaline protease from *Neurospora crassa*. Purification and partial characterization. *J Biol Chem* **256**, 811–4.
- Lindberg, R. A., Rhodes, W. G., Eirich, L. D. & Drucker, H. (1982). Extracellular acid proteases from *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* **150**, 1103–8.
- Lu, X., Sun, J., Nimtz, M., Wissing, J., Zeng, A.-P. & Rinas, U. (2010). The intra- and extracellular proteome of *Aspergillus niger* growing on defined medium with xylose or maltose as carbon substrate. *Microb Cell Fact* **9**, 23.
- Ma, H., Kunes, S., Schatz, P. J. & Botstein, D. (1987). Plasmid construction by homologous recombination in yeast. *Gene* **58**, 201–16.
- MacKenzie, D. & Kraunsoe, J. (1998). Aberrant processing of wild-type and mutant bovine pancreatic trypsin inhibitor secreted by *Aspergillus niger*. *J ...* **63**, 137–146. Elsevier Sci B.V.
- Maddi, A., Bowman, S. M. & Free, S. J. (2009). Trifluoromethanesulfonic acid-based proteomic analysis of cell wall and secreted proteins of the ascomycetous fungi *Neurospora crassa* and *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol* **46**, 768–81.
- Maeng, B. H., Choi, J., Sa, Y. S., Shin, J. H. & Kim, Y. H. (2012). Functional expression of recombinant anti-BNP scFv in methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and application as a recognition molecule in electrochemical sensors. *World J Microbiol Biotechnol* **28**, 1027–34.
- Maier, T., Güell, M. & Serrano, L. (2009). Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett* **583**, 3966–73. Elsevier.
- Marin, M. (2008). Folding at the rhythm of the rare codon beat. *Biotechnol J* **3**, 1047–1057.
- Mattern, I. E., van Noort, J. M., van den Berg, P., Archer, D. B., Roberts, I. N. & van den Hondel, C. a M. J. J. (1992). Isolation and characterization of mutants of *Aspergillus niger* deficient in extracellular proteases. *MGG Mol Gen Genet* **234**, 332–336.
- McIntyre, M., Eade, J. K., Cox, P. W., Thomas, C. R., White, S., Berry, D. R. & McNeil, B. (2001). Quantification of autolysis in *Penicillium chrysogenum* by semiautomated image analysis. *Can J Microbiol* **47**, 315–321. NRC Research Press Ottawa, Canada.
- McNally, M. T. & Free, S. J. (1988). Isolation and characterization of a *Neurospora* glucose-repressible gene. *Curr Genet* **14**, 545–51.
- McNeil, B., Berry, D. R., Harvey, L. M., Grant, A. & White, S. (1998). Measurement of autolysis in submerged batch cultures of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol Bioeng* **57**, 297–305.
- Menzella, H. G. (2011). Comparison of two codon optimization strategies to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* **10**, 15.
- Metzenberg, R. L. (2004). Bird Medium: an alternative to Vogel Medium. *Fungal Genet Newsl* **51**, 19–20.
- Michaelsen, T. E. & Natvig, J. B. (1972). Three new fragments, F(ab) 2 , F(c) 2 , and Fab-c, obtained by papain proteolysis of normal human IgG. *Scand J Immunol* **1**, 255–68.
- Molinari, M., Galli, C., Vanoni, O., Arnold, S. M. & Kaufman, R. J. (2005). Persistent glycoprotein misfolding activates the glucosidase II/UGT1-driven calnexin cycle to delay aggregation and loss of folding competence. *Mol Cell* **20**, 503–12.
- Montero-Barrientos, M., Cardoza, R. E., Gutiérrez, S., Monte, E. & Hermosa, R. (2007). The heterologous overexpression of hsp23, a small heat-shock protein gene from *Trichoderma virens*, confers thermotolerance to *T. harzianum*. *Curr Genet* **52**, 45–53.
- Münger, K., Germann, U. A. & Lerch, K. (1987). The *Neurospora crassa* metallothionein gene. Regulation of expression and chromosomal location. *J Biol Chem* **262**, 7363–7.
- Murray, S. . & Neville, A. . (1998). The role of pH, temperature and nucleation in the formation of cholesteric liquid crystal spherulites from chitin and chitosan. *Int J Biol Macromol* **22**, 137–144.
- Nakano, E., Fox, R., Clements, D. & Koo, K. (1993). Expression vectors for *Neurospora crassa* and expression of a bovine preprochymosin cDNA. *Fungal Genet Newsl*.
- Nandy, A., Petersen, A., Wald, M., Suck, R., Kahlert, H., Weber, B., Becker, W. M., Cromwell, O. & Fiebig, H. (2005). Primary structure, recombinant expression, and molecular characterization of Phl p 4, a major allergen of timothy grass (*Phleum pratense*). *Biochem Biophys Res Commun* **337**, 563–570.

- Nelson, G., Kozlova-Zwinderman, O., Collis, A. J., Knight, M. R., Fincham, J. R. S., Stanger, C. P., Renwick, A., Hensing, J. G. M., Punt, P. J. & other authors. (2004). Calcium measurement in living filamentous fungi expressing codon-optimized aequorin. *Mol Microbiol* **52**, 1437–50.
- Neustroev, K. N., Valter, S. N., Timchenko, N. V., Firsov, L. M., Golubev, A. M. & Khokhlov, S. E. (1993). Adsorption of glucoamylase from *Asp. awamori* X-100/D27 on cell walls. *Biochem Mol Biol Int* **30**, 115–20.
- Nevalainen, H. & Peterson, R. (2014). Making recombinant proteins in filamentous fungi- are we expecting too much? *Front Microbiol* **5**, 75.
- Nevalainen, K. M. H., Te'o, V. S. J. & Bergquist, P. L. (2005). Heterologous protein expression in filamentous fungi. *Trends Biotechnol* **23**, 468–474.
- Ng, D. T., Brown, J. D. & Walter, P. (1996). Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* **134**, 269–78.
- Nielsen, J. (1992). Modelling the growth of filamentous fungi. In *Modern Biochem Eng*, pp. 187–223.
- Ninomiya, Y., Suzuki, K., Ishii, C. & Inoue, H. (2004). Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12248–53.
- Norouziyan, D., Akbarzadeh, A., Scharer, J. M. & Moo Young, M. (2006). Fungal glucoamylases. *Biotechnol Adv* **24**, 80–5.
- Nothwehr, S. F. & Gordon, J. I. (1990). Targeting of proteins into the eukaryotic secretory pathway: signal peptide structure/function relationships. *Bioessays* **12**, 479–84.
- Nykanen, M., Saarelainen, R., Raudaskoski, M., Nevalainen, K. & Mikkonen, A. (1997). Expression and Secretion of Barley Cysteine Endopeptidase B and Cellobiohydrolase I in *Trichoderma reesei*. *Appl Environ Microbiol* **63**, 4929–37.
- Nyyssönen, E., Penttilä, M., Harkki, A., Saloheimo, A., Knowles, J. K. C. & Keränen, S. (1993). Efficient production of antibody fragments by the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Biotechnology (N Y)* **11**, 591–5. Nature Publishing Company.
- O'Donnell, D., Wang, L., Xu, J., Ridgway, D., Gu, T. & Moo-Young, M. (2001). Enhanced heterologous protein production in *Aspergillus niger* through pH control of extracellular protease activity. *Biochem Eng J* **8**, 187–193.
- Otto, R., Santagostino, A. & Schrader, U. (2014). Rapid growth in biopharma: Challenges and opportunities. *From Sci to Oper Quest Choices Strateg Success Biopharma*.
- Palma-Guerrero, J., Hall, C. R., Kowbel, D., Welch, J., Taylor, J. W., Brem, R. B. & Glass, N. L. (2013). Genome wide association identifies novel loci involved in fungal communication. *PLoS Genet* **9**, e1003669.
- Pandey, A., Roca, M. G., Read, N. D. & Glass, N. L. (2004). Role of a mitogen-activated protein kinase pathway during conidial germination and hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* **3**, 348–58.
- Papagianni, M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol Adv* **22**, 189–259.
- Pedersen, H., Beyer, M. & Nielsen, J. (2000). Glucoamylase production in batch, chemostat and fed-batch cultivations by an industrial strain of *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol* **53**, 272–7.
- Petersson, L., Ståde, L. W., Brofelth, M., Gärtner, S., Fors, E., Sandgren, M., Vallkil, J., Olsson, N., Larsen, K. L. & other authors. (2014). Molecular design of recombinant scFv antibodies for site-specific photocoupling to β -cyclodextrin in solution and onto solid support. *Biochim Biophys Acta* **1844**, 2164–2173.
- Plotkin, J. B. & Kudla, G. (2011). Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias. *Nat Rev Genet* **12**, 32–42.
- Polizeli, M. de L., Jorge, J. A. & Terenzi, H. F. (1991). Pectinase production by *Neurospora crassa*: purification and biochemical characterization of extracellular polygalacturonase activity. *J Gen Microbiol* **137**, 1815–23.
- Potgieter, T. I., Cukan, M., Drummond, J. E., Houston-Cummings, N. R., Jiang, Y., Li, F., Lynaugh, H., Mallem, M., McKelvey, T. W. & other authors. (2009). Production of monoclonal antibodies by glycoengineered *Pichia pastoris*. *J Biotechnol* **139**, 318–25.
- Potgieter, T. I., Kersey, S. D., Mallem, M. R., Nylén, A. C. & d'Anjou, M. (2010). Antibody expression kinetics in glycoengineered *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng* **106**, 918–27.
- Powers, D. B., Amersdorfer, P., Poul, M., Nielsen, U. B., Shalaby, M. R., Adams, G. P., Weiner, L. M. & Marks, J. D. (2001). Expression of single-chain Fv-Fc fusions in *Pichia pastoris*. *J Immunol Methods* **251**, 123–35.
- Prosser, J. I. & Tough, A. J. (1991). Growth mechanisms and growth kinetics of filamentous microorganisms. *Crit Rev Biotechnol* **10**, 253–74. Informa UK Ltd UK.
- Prosser, J. I. (1995). *Kinetics of Filamentous Growth and Branching. Grow Fungus* (N. A. R. Gow & G. M. Gadd, Eds.). Dordrecht: Springer Netherlands.

- Punt, P. J., Dingemanse, M. A., Kuyvenhoven, A., Soede, R. D., Pouwels, P. H. & van den Hondel, C. A. (1990). Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans* *gpdA* gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Gene* **93**, 101–9.
- Rasmussen-Wilson, S. J., Palas, J. S., Wolf, V. J., Taft, C. S. & Selitrennikoff, C. P. (1997). Expression of a plant protein by *Neurospora crassa*. *Appl Environ Microbiol* **63**, 3488–93.
- Read, N. D. (2011). Exocytosis and growth do not occur only at hyphal tips. *Mol Microbiol* **81**, 4–7.
- Redding, K., Holcomb, C. & Fuller, R. S. (1991). Immunolocalization of Kex2 protease identifies a putative late Golgi compartment in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **113**, 527–38.
- Rhodes, W. G., Lindberg, R. A. & Drucker, H. (1983). Purification and characterization of an extracellular acid protease from *Neurospora crassa*. *Arch Biochem Biophys* **223**, 514–520.
- Righelato, R. C., Trinci, a P., Pirt, S. J. & Peat, a. (1968). The influence of maintenance energy and growth rate on the metabolic activity, morphology and conidiation of *Penicillium chrysogenum*. *J Gen Microbiol* **50**, 399–412.
- Righetti, P. G. (1990). Recent developments in electrophoretic methods. *J Chromatogr* **516**, 3–22.
- Riquelme, M. (2013). Tip growth in filamentous fungi: a road trip to the apex. *Annu Rev Microbiol* **67**, 587–609.
- Riquelme, M., Yarden, O., Bartnicki-Garcia, S., Bowman, B., Castro-Longoria, E., Free, S. J., Fleissner, A., Freitag, M., Lew, R. R. & other authors. (2011). Architecture and development of the *Neurospora crassa* hypha -- a model cell for polarized growth. *Fungal Biol* **115**, 446–74.
- Riquelme, M., Bredeweg, E. L., Callejas-Negrete, O., Roberson, R. W., Ludwig, S., Beltrán-Aguilar, A., Seiler, S., Novick, P. & Freitag, M. (2014). The *Neurospora crassa* exocyst complex tethers Spitzenkörper vesicles to the apical plasma membrane during polarized growth. *Mol Biol Cell* **25**, 1312–26.
- Rödig, J. V., Rapp, E., Böhne, J., Kampe, M., Kaffka, H., Bock, A., Genzel, Y. & Reichl, U. (2013). Impact of cultivation conditions on N-glycosylation of influenza virus haemagglutinin produced in MDCK cell culture. *Biotechnol Bioeng* **110**, 1691–703.
- Roos, W. & Luckner, M. (1984). Relationships Between Proton Extrusion and Fluxes of Ammonium Ions and Organic Acids in *Penicillium cyclopium*. *Microbiology* **130**, 1007–1014.
- Rosfarizan, M. & Ariff, a B. (2000). Kinetics of kojic acid fermentation by *Aspergillus flavus* using different types and concentrations of carbon and nitrogen sources 20–24.
- Ross, J. (1996). Control of messenger RNA stability in higher eukaryotes. *Trends Genet* **12**, 171–175.
- Ruoff, P., Behzadi, A., Hauglid, M., Vinsjevik, M. & Havås, H. (2000). pH homeostasis of the circadian sporulation rhythm in clock mutants of *Neurospora crassa*. *Chronobiol Int* **17**, 733–50.
- Ryan, M. P., Williams, D. E., Chater, R. J., Hutton, B. M. & McPhail, D. S. (2002). Why stainless steel corrodes. *Nature* **415**, 770–774.
- Sakaguchi, M. (1997). Eukaryotic protein secretion. *Curr Opin Biotechnol* **8**, 595–601.
- Sasaguri, S., Maruyama, J., Moriya, S., Kudo, T., Kitamoto, K. & Arioka, M. (2008). Codon optimization prevents premature polyadenylation of heterologously-expressed cellulases from termite-gut symbionts in *Aspergillus oryzae*. *J Gen Appl Microbiol* **54**, 343–51.
- Sauer, J., Sigurskjöld, B. W., Christensen, U., Frandsen, T. P., Mirgorodskaya, E., Harrison, M., Roepstorff, P. & Svensson, B. (2000). Glucoamylase: structure/function relationships, and protein engineering. *Biochim Biophys Acta* **1543**, 275–293.
- Schein, C. H. (1989). Production of Soluble Recombinant Proteins in Bacteria. *Nat Biotechnol* **7**, 1141–1149. Nature Publishing Company.
- Schilling, B., Linden, R. M., Kupper, U. & Lerch, K. (1992). Expression of *Neurospora crassa* laccase under the control of the copper-inducible metallothionein-promoter. *Curr Genet* **22**, 197–203.
- Schmit, J. C., Edson, C. M. & Brody, S. (1975). Changes in glucosamine and galactosamine levels during conidial germination in *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* **122**, 1062–1070.
- Schnabel, R., Hutter, H., Moerman, D. & Schnabel, H. (1997). Assessing normal embryogenesis in *Caenorhabditis elegans* using a 4D microscope: variability of development and regional specification. *Dev Biol* **184**, 234–65.
- Schürg, T., Brandt, U., Adis, C. & Fleissner, A. (2012). The *Saccharomyces cerevisiae* BEM1 homologue in *Neurospora crassa* promotes co-ordinated cell behaviour resulting in cell fusion. *Mol Microbiol* **86**, 349–66.
- Schuster, A. & Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of Trichoderma. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**, 787–99.
- Shear, C. L. & Dodge, B. O. (1927). Life Histories and Heterothallism of the Red Bread-Mold Fungi of the *Monilia sitophila* group. *J Agric Res* **34**, 1019–1042.
- Shwab, E. K. & Keller, N. P. (2008). Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes. *Mycol Res* **112**, 225–30.

- Sigmund, R., McNally, M., Lee, D. & Free, S. (1985). Neurospora glucamylase and a mutant affected in its regulation. *Biochem Genet* **23**, 89–103.
- Simmons, L. C., Reilly, D., Klimowski, L., Shantha Raju, T., Meng, G., Sims, P., Hong, K., Shields, R. L., Damico, L. A. & other authors. (2002). Expression of full-length immunoglobulins in Escherichia coli: rapid and efficient production of aglycosylated antibodies. *J Immunol Methods* **263**, 133–147.
- Slayman, C. L. & Slayman, C. W. (1968). Net uptake of potassium in Neurospora. Exchange for sodium and hydrogen ions. *J Gen Physiol* **52**, 424–43. The Rockefeller University Press.
- Sletta, H., Nedal, A., Aune, T. E. V., Hellebust, H., Hakvåg, S., Aune, R., Ellingsen, T. E., Valla, S. & Brautaset, T. (2004). Broad-host-range plasmid pJB658 can be used for industrial-level production of a secreted host-toxic single-chain antibody fragment in Escherichia coli. *Appl Environ Microbiol* **70**, 7033–9.
- Sohail, M., Siddiqi, R., Ahmad, A. & Khan, S. A. (2009). Cellulase production from Aspergillus niger MS82: effect of temperature and pH. *N Biotechnol* **25**, 437–441.
- Sotiriadis, A., Keshavarz, T. & Keshavarz-Moore, E. (2001). Factors affecting the production of a single-chain antibody fragment by Aspergillus awamori in a stirred tank reactor. *Biotechnol Prog* **17**, 618–23.
- Spencer, J. & Jeenes, D. (1998). Determinants of the fidelity of processing glucoamylase-lysozyme fusions by Aspergillus niger. *Eur J ...* **258**, 107–112.
- Spinelli, L. (1996). Biochemical characterization of glucoamylase from the hyperproducer exo-1 mutant strain of Neurospora crassa. *FEMS Microbiol Lett* **138**, 173–177.
- Staben, C., Jensen, B., Singer, M., Pollock, J., Schechtman, M., Kinsey, J. & Selker, E. (1989). Use of a bacterial Hygromycin B resistance gene as a dominant selectable marker in Neurospora crassa transformation. *Fungal Genet Newsl* **36**, 79.
- Steinwand, M., Droste, P., Frenzel, A., Hust, M., Dübel, S. & Schirrmann, T. (2013). The influence of antibody fragment format on phage display based affinity maturation of IgG. *MAbs* **6**, 204–18.
- Stone, P. J., Makoff, A. J., Parish, J. H. & Radford, A. (1993). Cloning and sequence analysis of the glucoamylase gene of Neurospora crassa. *Curr Genet* **24**, 205–11.
- Su, X., Schmitz, G., Zhang, M., Mackie, R. I. & Cann, I. K. O. (2012). Heterologous gene expression in filamentous fungi. *Adv Appl Microbiol* **81**, 1–61.
- Sun, J., Phillips, C. M., Anderson, C. T., Beeson, W. T., Marletta, M. A. & Glass, N. L. (2011). Expression and characterization of the Neurospora crassa endoglucanase GH5-1. *Protein Expr Purif* **75**, 147–54. Elsevier Inc.
- Swift, R. J., Wiebe, M. G., Robson, G. D. & Trinci, A. P. (1998). Recombinant glucoamylase production by Aspergillus niger B1 in chemostat and pH auxostat cultures. *Fungal Genet Biol* **25**, 100–9.
- Szabó, I. J., Johansson, G. & Pettersson, G. (1996). Optimized cellulase production by Phanerochaete chrysosporium: control of catabolite repression by fed-batch cultivation. *J Biotechnol* **48**, 221–230.
- Taheri-Talesh, N., Horio, T., Araujo-Bazán, L., Dou, X., Espeso, E. A., Peñalva, M. A., Osmani, S. A. & Oakley, B. R. (2008). The tip growth apparatus of Aspergillus nidulans. *Mol Biol Cell* **19**, 1439–49.
- Te'o, V. S., Cziferszky, A. E., Bergquist, P. L. & Nevalainen, K. M. (2000). Codon optimization of xylanase gene xynB from the thermophilic bacterium Dictyoglomus thermophilum for expression in the filamentous fungus Trichoderma reesei. *FEMS Microbiol Lett* **190**, 13–9.
- Temporini, E. D., Alvarez, M. E., Mautino, M. R., Folco, H. D. & Rosa, A. L. (2004). The Neurospora crassa cfp promoter drives a carbon source-dependent expression of transgenes in filamentous fungi. *J Appl Microbiol* **96**, 1256–64.
- Thanaraj, T. a & Argos, P. (1996). Protein secondary structural types are differentially coded on messenger RNA. *Protein Sci* **5**, 1973–1983.
- Thie, H., Toleikis, L., Li, J., von Wasielewski, R., Bastert, G., Schirrmann, T., Esteves, I. T., Behrens, C. K., Fournes, B. & other authors. (2011). Rise and fall of an anti-MUC1 specific antibody. *PLoS One* **6**, e15921.
- Tremmel, D., Duarte, M., Videira, A. & Tropschug, M. (2007). FKBP22 is part of chaperone/folding catalyst complexes in the endoplasmic reticulum of Neurospora crassa. *FEBS Lett* **581**, 2036–40.
- Trevithick, J. R. & Metzenberg, R. L. (1966a). Molecular sieving by Neurospora cell walls during secretion of invertase isozymes. *J Bacteriol* **92**, 1010–1015.
- Trevithick, J. R. & Metzenberg, R. L. (1966b). Genetic alteration of pore size and other properties of the Neurospora cell wall. *J Bacteriol* **92**, 1016–1020.
- Trinci, A. P. (1974). A study of the kinetics of hyphal extension and branch initiation of fungal mycelia. *J Gen Microbiol* **81**, 225–36.
- Tripathi, N. (2009). High Yield Production of Heterologous Proteins with Escherichia coli. *Def Sci J* **59**, 137–146.
- Umraht, F. (2015). *Heterologe Proteinexpression in Neurospora crassa: Stammkonstruktion und Produktion von Aprotinin (BPTI) in einem parallelen Laborbioreaktorsystem.*

- Valkonen, M., Ward, M., Wang, H., Penttilä, M. & Saloheimo, M. (2003). Improvement of foreign-protein production in *Aspergillus niger* var. *awamori* by constitutive induction of the unfolded-protein response. *Appl Environ Microbiol* **69**, 6979–86.
- Verdoes, J. C., Punt, P. J., Schrickx, J. M., van Verseveld, H. W., Stouthamer, A. H. & van den Hondel, C. A. (1993). Glucoamylase overexpression in *Aspergillus niger*: molecular genetic analysis of strains containing multiple copies of the *glaA* gene. *Transgenic Res* **2**, 84–92.
- Verhoeyen, M., Milstein, C. & Winter, G. (1988). Reshaping human antibodies: grafting an antilysozyme activity. *Science* **239**, 1534–6.
- Vernen, F. (2013). *Heterologe Proteinexpression in Neurospora crassa: Wachstums- und Produktbildungsverhalten im single-use System*. Technische Universität Braunschweig.
- Van Verseveld, H. W., Metwally, M., el Sayed, M., Osman, M., Schrickx, J. M. & Stouthamer, A. H. (1991). Determination of the maximum product yield from glucoamylase-producing *Aspergillus niger* grown in the recycling fermentor. *Antonie Van Leeuwenhoek* **60**, 313–323.
- Vogel, H. J. (1956). A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). *Microbial Genet Bull* **13**, 42–43.
- Waldron, C. & Lacroute, F. (1975). Effect of growth rate on the amounts of ribosomal and transfer ribonucleic acids in yeast. *J Bacteriol* **122**, 855–865.
- Walsh, G. (2006). Biopharmaceutical benchmarks 2006. *Nat Biotechnol* **24**, 769–76. Nature Publishing Group.
- Walsh, G. (2010). Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nat Biotechnol* **28**, 917–24. Nature Publishing Group.
- Walsh, G. (2012). New Biopharmaceuticals. *BioPharm Int* **25**.
- Walsh, G. (2014a). Biopharmaceuticals Approval Trends in 2013. *BioPharm Int*.
- Walsh, G. (2014b). Biopharmaceutical benchmarks 2014. *Nat Biotechnol* **32**, 992–1000. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.
- Wang, L., Ridgway, D., Gu, T. & Moo-Young, M. (2005). Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. *Biotechnol Adv* **23**, 115–29.
- Wang, Z., Deak, M. & Free, S. J. (1994). A cis-acting region required for the regulated expression of *grg-1*, a *Neurospora* glucose-repressible gene. Two regulatory sites (CRE and NRS) are required to repress *grg-1* expression. *J Mol Biol* **237**, 65–74.
- Ward, M., Wilson, L. J., Kodama, K. H., Rey, M. W. & Berka, R. M. (1990). Improved production of chymosin in *Aspergillus* by expression as a glucoamylase-chymosin fusion. *Biotechnology (N Y)* **8**, 435–440. Nature Publishing Company.
- Ward, M., Lin, C., Victoria, D. C., Fox, B. P., Fox, J. A., Wong, D. L., Meerman, H. J., Pucci, J. P., Fong, R. B. & other authors. (2004). Characterization of humanized antibodies secreted by *Aspergillus niger*. *Appl Environ Microbiol* **70**, 2567–76.
- Ward, O. P. (2012). Production of recombinant proteins by filamentous fungi. *Biotechnol Adv* **30**, 1119–39. Elsevier B.V.
- Ward, P. P., May, G. S., Headon, D. R. & Conneely, O. M. (1992). An inducible expression system for the production of human lactoferrin in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **122**, 219–23.
- Wen Su, W. & Jun He, B. (1997). Secreted enzyme production by fungal pellets in a perfusion bioreactor. *J Biotechnol* **54**, 43–52.
- Werner, P. (2013). *Etablierung eines lichtinduzierbaren Expressionssystems und Untersuchung des Sekretionsvermögens morphologischer Mutanten von Neurospora crassa*.
- White, S., McIntyre, M., Berry, D. R. & McNeil, B. (2002). The autolysis of industrial filamentous fungi. *Crit Rev Biotechnol* **22**, 1–14.
- Wiebe, M. G., Karandikar, A., Robson, G. D., Trinci, A. P., Candia, J. L., Trappe, S., Wallis, G., Rinas, U., Derkx, P. M. & other authors. (2001). Production of tissue plasminogen activator (t-PA) in *Aspergillus niger*. *Biotechnol Bioeng* **76**, 164–74.
- Wosten, H. A. B., Moukha, S. M., Sietsma, J. H. & Wessels, J. G. H. (1991). Localization of growth and secretion of proteins in *Aspergillus niger*. *J Gen Microbiol* **137**, 2017–2023.
- Wu, S. C., Ye, R., Wu, X. C., Ng, S. C. & Wong, S. L. (1998). Enhanced secretory production of a single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis* by coproduction of molecular chaperones. *J Bacteriol* **180**, 2830–5.
- Wurm, F. M. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol* **22**, 1393–8. Nature Publishing Group.
- Xie, X., Wilkinson, H. H., Correa, A., Lewis, Z. a., Bell-Pedersen, D. & Ebbole, D. J. (2004). Transcriptional response to glucose starvation and functional analysis of a glucose transporter of *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* **41**, 1104–1119.
- Xiong, Y., Sun, J. & Glass, N. L. (2014). VIB1, a link between glucose signaling and carbon catabolite repression, is essential for plant cell wall degradation by *Neurospora crassa*. *PLoS Genet* **10**, e1004500.

- Yoon, J., Aishan, T., Maruyama, J. & Kitamoto, K. (2010).** Enhanced production and secretion of heterologous proteins by the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* via disruption of vacuolar protein sorting receptor gene Aovps10. *Appl Environ Microbiol* **76**, 5718–27.
- Yoon, J., Maruyama, J. & Kitamoto, K. (2011).** Disruption of ten protease genes in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* highly improves production of heterologous proteins. *Appl Microbiol Biotechnol* **89**, 747–59.
- Yoon, S. K., Kim, S. H. & Lee, G. M. (2003).** Effect of low culture temperature on specific productivity and transcription level of anti-4-1BB antibody in recombinant Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Prog* **19**, 1383–6.
- Yuskevich, V., Khodarovich, Y., Kagarliskiy, G., Stremovskiy, O., Maksimenko, O., Lukash, S., Polanovsky, O. & Deyev, S. (2011).** Expression of humanized anti-Her2/neu single-chain IgG1-like antibody in mammary glands of transgenic mice. *Biochimie* **93**, 628–30.
- Zalucki, Y. M., Jones, C. E., Ng, P. S. K., Schulz, B. L. & Jennings, M. P. (2010).** Signal sequence non-optimal codons are required for the correct folding of mature maltose binding protein. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* **1798**, 1244–1249. Elsevier B.V.
- Zhang, G., Zhu, Y., Wei, D. & Wang, W. (2014).** Enhanced production of heterologous proteins by the filamentous fungus *Trichoderma reesei* via disruption of the alkaline serine protease SPW combined with a pH control strategy. *Plasmid* **71**, 16–22.
- Zhang, J., Robinson, D. & Salmon, P. (2006).** A novel function for selenium in biological system: selenite as a highly effective iron carrier for Chinese hamster ovary cell growth and monoclonal antibody production. *Biotechnol Bioeng* **95**, 1188–97.
- Zhou, M., Guo, J., Cha, J., Chae, M., Chen, S., Barral, J. M., Sachs, M. S. & Liu, Y. (2013).** Non-optimal codon usage affects expression, structure and function of clock protein FRQ. *Nature* **495**, 111–5.
- Zhu, J. (2012).** Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnol Adv* **30**, 1158–70.

6 Anhang

6.1 Ergänzende Ergebnisse

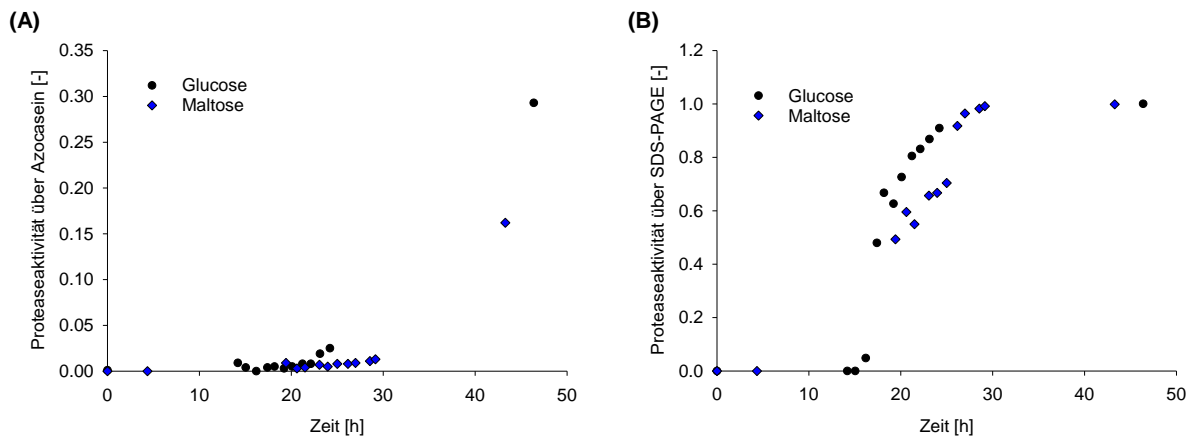


Abb. 6.1: Die für den scFv HT186-D11 spezifische Proteaseaktivität kann nur mit der Methode basierend auf einer SDS-PAGE und Abbau des scFv detektiert werden. Der Stamm DHN-201 (*his-3⁺::P_{vvd}-glat-ht186-13xmyc, exo-1, Δvib-1, Δvvd*) wurde in einem regulierten 1 L-Bioreaktorsystem (800 ml Arbeitsvolumen) in zwei verschiedenen Zeiträumen bei 30 °C in Minimalmedium mit Glucose oder Maltose kultiviert. Der Gelöstsauerstoffwert wurde bei Erreichen von 20 % konstant gehalten und der Startwert der Rührerdrehzahl betrug 100 rpm. Der pH-Wert wurde mit einer 12.5 %igen Ammoniaklösung auf 4,5 geregelt. Die Reaktoren wurden durchgehend mit einer Lichtquelle bestrahlt, um den *vvd*-Promotor zu aktivieren. Es wurden Proteaseassays unter Verwendung des Farbstoffes Azocasein (A) und gegenüberstellend mit SDS-PAGE und Abbau HT186-D11 (B) verglichen. In beiden Fällen wurden ungefällte Kulturüberstände für 24 h bei 30 °C mit der Testlösung inkubiert und Medium als Kontrolle eingesetzt. Für (A) wurde eine Azocaseinlösung (5 mg/ml) eingesetzt. Mittels Trichloressigsäure wurde ungespaltenes Azocasein gefällt und die Absorption bei 440 nm des Überstandes gemessen. Erhöhte Absorptionswerte zeigen eine Proteaseaktivität auf. Für (B) wurden die Gele des Protease-Assays aus Abb. 3.21 grafisch mit der Software ImageJ ausgewertet und die Proteaseaktivität berechnet. Dafür wurden die Intensitäten der Banden bei ca. 30 kD bestimmt und mit der Kontrolle verglichen.

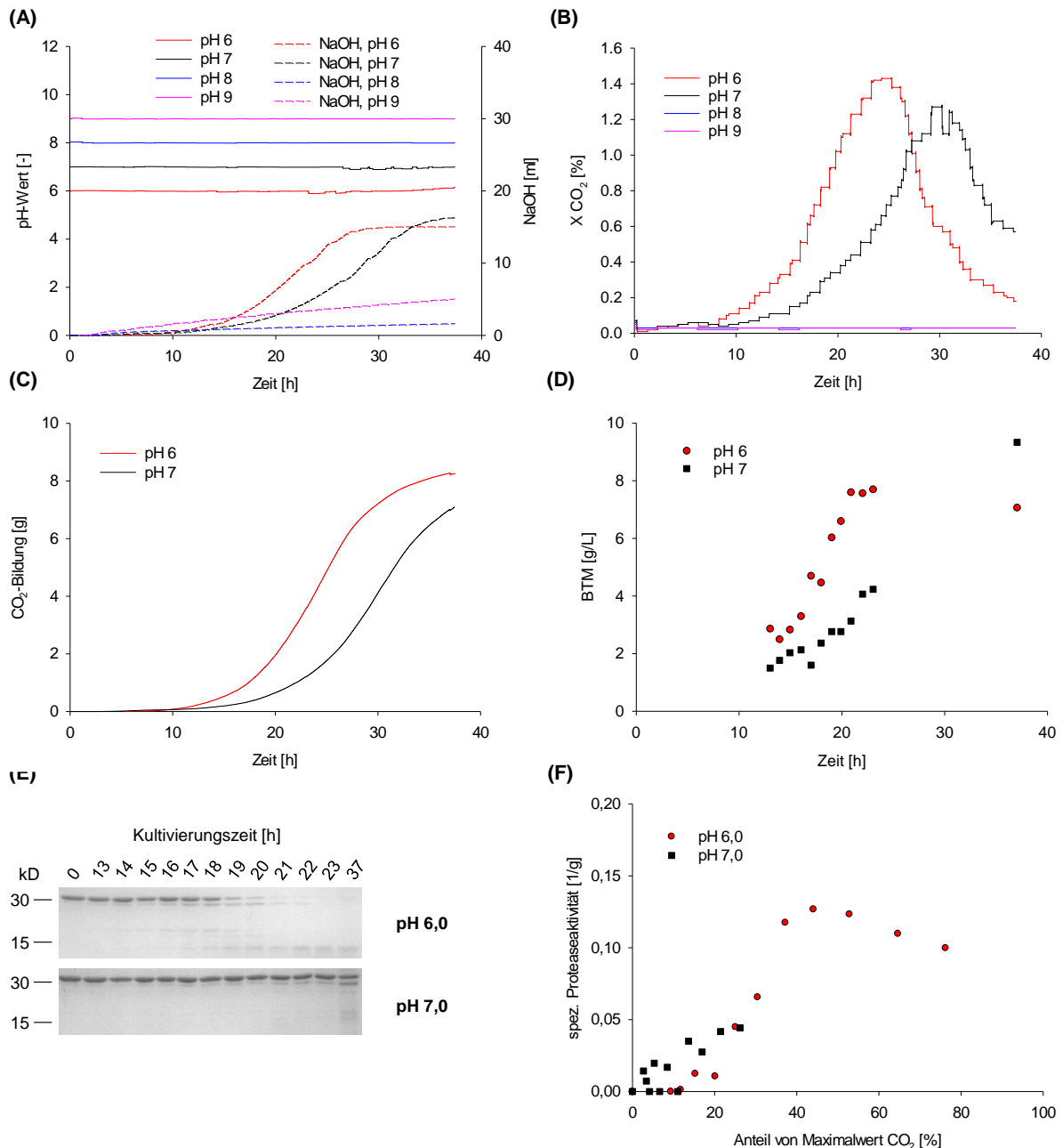


Abb. 6.2: Bei zu hohen pH-Werten kann *N. crassa* nicht auskeimen und wachsen, höhere pH-Werte führen nur augenscheinlich zu einem Ausbleiben der Proteaseaktivität. Der Stamm DHN-201 (*his-3⁺::Pvvd-glat-ht186-13xmyc, exo-1, Δvib-1, Δvvd*) wurde in einem parallelen 1 L-Bioreaktorsystem (800 ml Arbeitsvolumen) bei 30 °C in optimiertem Bird Medium mit 20 g/L Maltose kultiviert. Der Gelöstsauerstoffwert wurde bei Erreichen von 20 % durch Regulation der Rührerdrehzahl konstant gehalten. Der pH-Wert wurde mit einer 2 M NaOH-Lösung auf den entsprechenden Wert von Beginn an geregelt (A). Der Anteil von Kohlenstoffdioxid (B) in der Abluft wurde gemessen und die ausgestoßene Menge zu jedem Zeitpunkt berechnet (C). Zusätzlich wurde die Biotrockenmasse bestimmt (D). Die Reaktoren wurden durchgehend mit einer Lichtquelle bestrahlt, um den *vvd*-Promotor zu aktivieren. Für den Protease-Assay (E) wurden ungefällte Kulturüberstände mit HT186-D11 (produziert in *E. coli*, ca. 1 µg) für 24 h bei 30 °C inkubiert. Als Kontrolle wurde der scFv mit Medium (0) inkubiert. Anschließend wurden die Proben in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Ein Fehlen der Bande bei 30 kD weist auf eine Proteaseaktivität hin, welche spezifisch für den eingesetzten scFv ist. Die Gele wurden grafisch mit der Software ImageJ ausgewertet und die spezifische Proteaseaktivität unter Verwendung der Biomasse berechnet (F). Dafür wurden die Intensitäten der Banden bei ca. 30 kD bestimmt und mit der Kontrolle verglichen. Die Aktivität wurde auf die prozentuale CO₂-Menge bezogen, die bis dahin von der Kultur gebildet wurde. 100 % entspricht dem Zeitpunkt des Absterbens der Kultur und somit dem Maximalwert von CO₂.

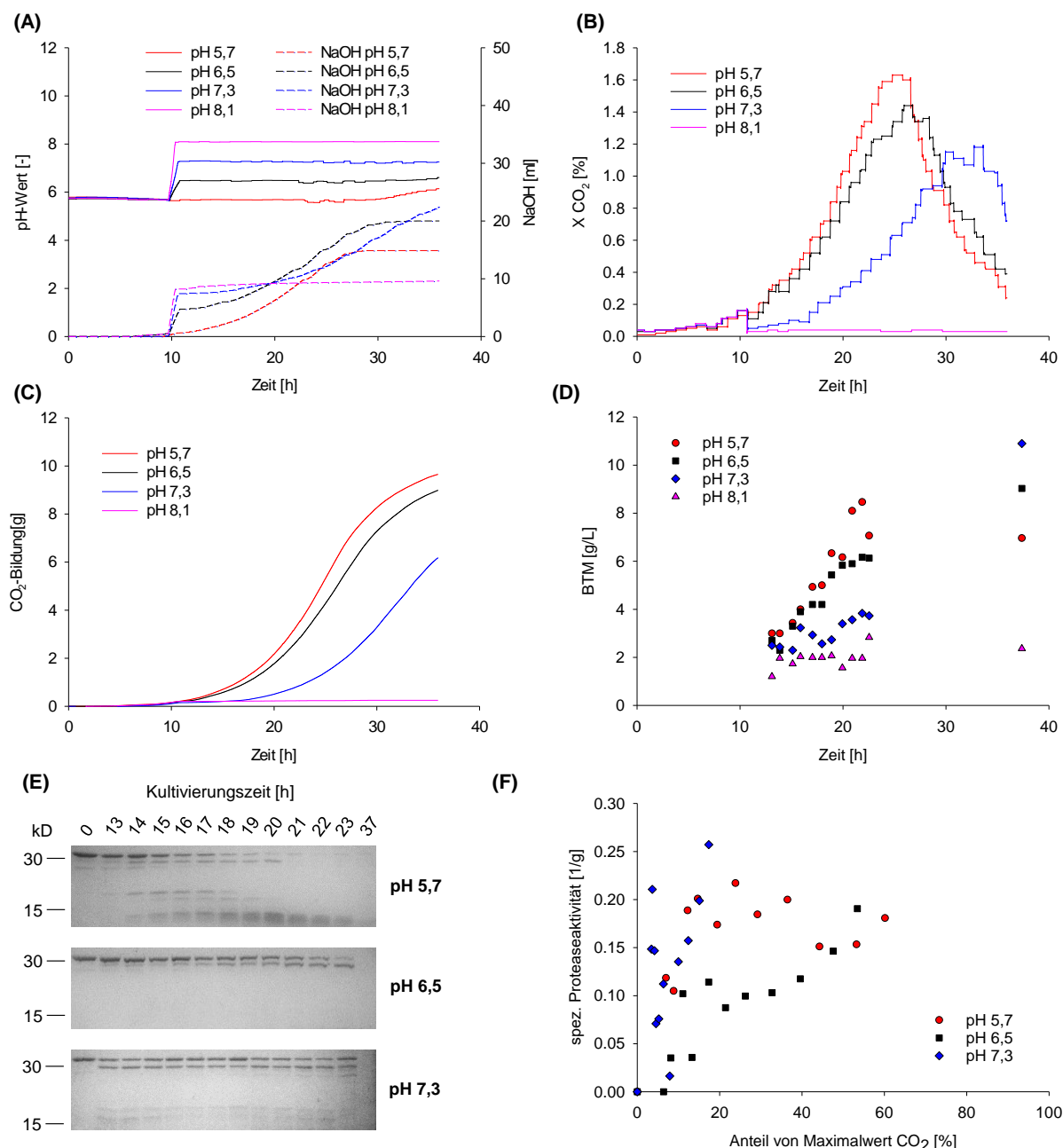


Abb. 6.3: Bei einem pH-Shift auf pH-Werte höher pH 8 stoppt das Wachstum der Kultur und sie stirbt ab, die geringste Proteaseaktivität wird bei pH 6,5 erreicht. Der Stamm DHN-201 (*his-3⁺::Pvvd-glat-ht186-13xmyc, exo-1, Δvib-1, Δvvd*) wurde in einem parallelen 1 L-Bioreaktorsystem (800 ml Arbeitsvolumen) bei 30 °C in optimiertem Bird Medium mit 20 g/L Maltose kultiviert. Der Gelöstsauerstoffwert wurde bei Erreichen von 20 % durch Regulation der Rührerdrehzahl konstant gehalten. Der pH-Wert wurde mit einer 2 M NaOH-Lösung für die ersten 10 h auf pH 5,7 geregelt. Anschließend wurde der pH sprunghaft auf den entsprechenden Wert erhöht und konstant gehalten (A). Der Anteil von Kohlenstoffdioxid (B) in der Abluft wurde gemessen und die ausgestoßene Menge zu jedem Zeitpunkt berechnet (C). Zusätzlich wurde die Biotrockenmasse bestimmt (D). Die Reaktoren wurden durchgehend mit einer Lichtquelle bestrahlt, um den *vvd*-Promotor zu aktivieren. Für den Protease-Assay (E) wurden ungefällte Kulturüberstände mit HT186-D11 (produziert in *E. coli*, ca. 1 µg) für 24 h bei 30 °C inkubiert. Als Kontrolle wurde der scFv mit Medium (0) inkubiert. Anschließend wurden die Proben in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Ein Fehlen der Bande bei 30 kD weist auf eine Proteaseaktivität hin, welche spezifisch für den eingesetzten scFv ist. Die Gele wurden grafisch mit der Software ImageJ ausgewertet und die spezifische Proteaseaktivität unter Verwendung der Biomasse berechnet (F). Dafür wurden die Intensitäten der Banden bei ca. 30 kD bestimmt und mit der Kontrolle verglichen. Die Aktivität wurde auf die prozentuale CO₂-Menge bezogen, die bis dahin von der Kultur gebildet wurde. 100 % entspricht dem Zeitpunkt des Absterbens der Kultur und somit dem Maximalwert von CO₂.

6.2 Plasmidkarten

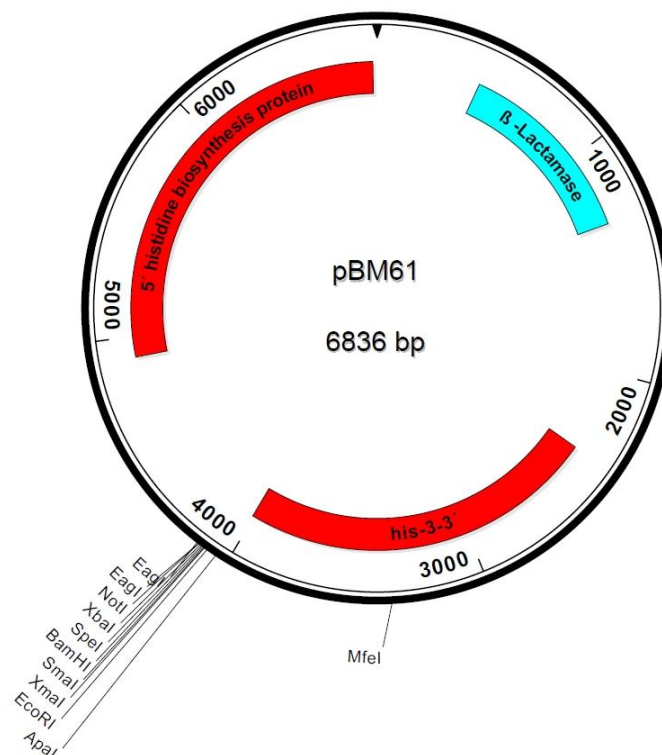


Abb. 6.4: Ausgangsplasmid pBM61 für die Integration einer Expressionskassette am *his-3*-Locus. Das Plasmid wurde vom FGSC bezogen.

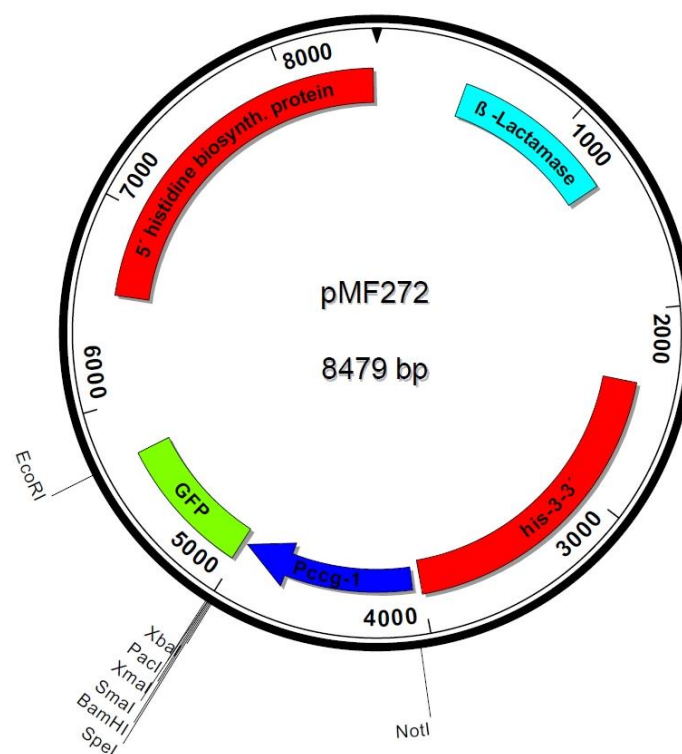


Abb. 6.5: Ausgangsplasmid pMF272 für die Integration einer Expressionskassette mit GFP am *his-3*-Locus. Das Plasmid wurde vom FGSC bezogen. Es wurde nur als Template bei einer PCR für die Amplifikation von *Pccg-1* sowie als Zwischenvektor für Klonierungsarbeiten benutzt.

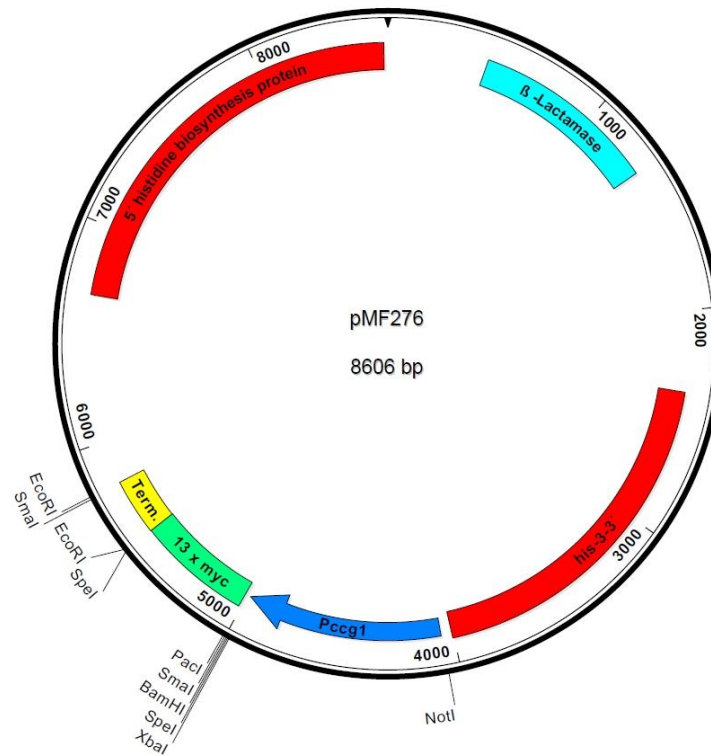
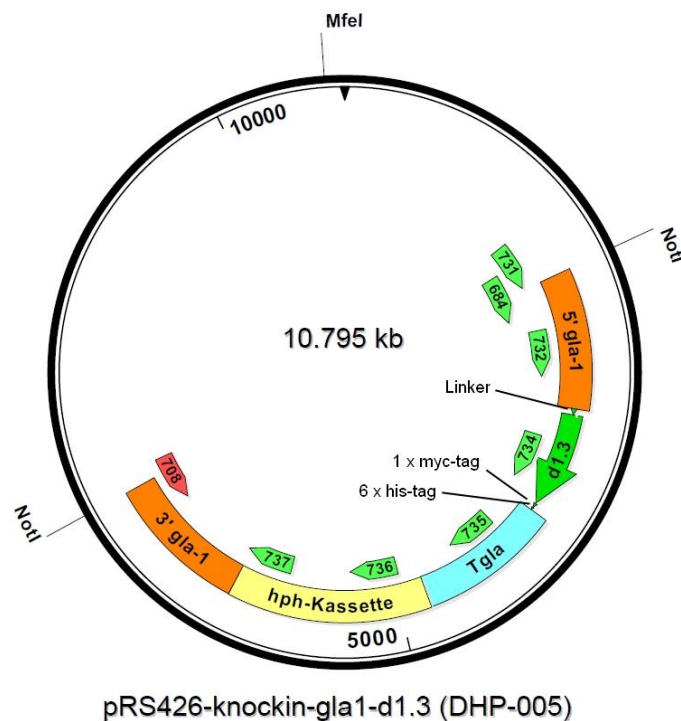
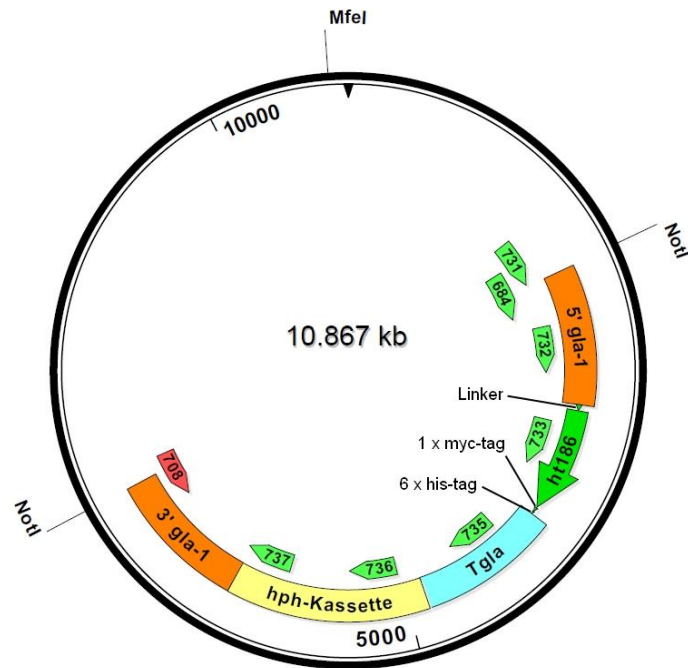


Abb. 6.6: Ausgangsplasmid pMF276 für die Integration einer Expressionskassette mit *13xmyc-tag* am *his-3*-Locus. Das Plasmid wurde vom FGSC bezogen.



pRS426-knockin-gla1-d1.3 (DHP-005)

Abb. 6.7: Hefepiasmid pRS426-knockin-gla1-d1.3 (DHP-005) nach rekombinanter Hefeklonierung. Nach der Hefeklonierung wurde das Plasmid in *E. coli* für weitere Arbeiten retransformiert. Anschließend wurde eine Sequenzierung durchgeführt mit den Primern 731, 732, 734, 735, 736 und 737. Dabei wurden keine Fehler festgestellt, die Sequenz ist korrekt. Für die Transformation von *N. crassa* wurde das Plasmid mit *NotI* und *MfeI* (*MunI*) geschnitten und mit dem Bereich zwischen den *NotI*-Schnittstellen transformiert.



pRS426-knockin-gla1-ht186-d11 (DHP-006)

Abb. 6.8: Hefeplasmid pRS426-knockin-gla1-ht186-d11 (DHP-006) nach rekombinanter Hefeklonierung. Nach der Hefeklonierung wurde das Plasmid in *E. coli* für weitere Arbeiten retransformiert. Anschließend wurde eine Sequenzierung durchgeführt mit den Primern 731, 732, 733, 735, 736 und 737. Dabei wurden keine Fehler festgestellt, die Sequenz ist korrekt. Für die Transformation von *N. crassa* wurde das Plasmid mit *NotI* und *MfeI* (*MunI*) geschnitten und mit dem Bereich zwischen den *NotI*-Schnittstellen transformiert.

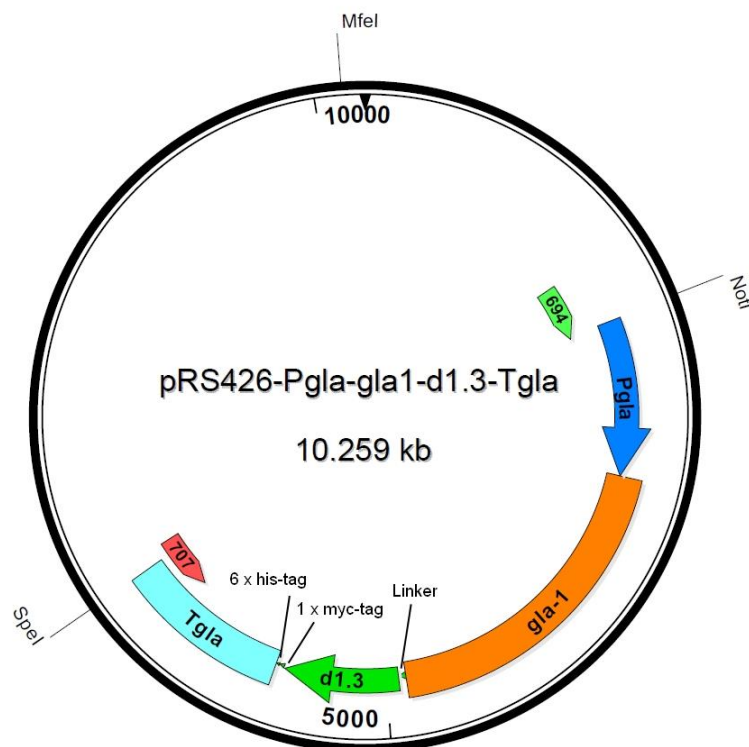


Abb. 6.9: Hefeplasmid pRS426-Pgla-gla1-d1.3-Tgla (DHP-007) nach rekombinanter Hefeklonierung. Nach der Hefeklonierung wurde das Plasmid in *E. coli* für weitere Arbeiten retransformiert. Für die Umklonierung wurde das Plasmid mit *NotI*, *SpeI* und *MfeI* (*MunI*) geschnitten und den Bereich zwischen den *NotI*- und *SpeI*-Schnittstellen verwendet.

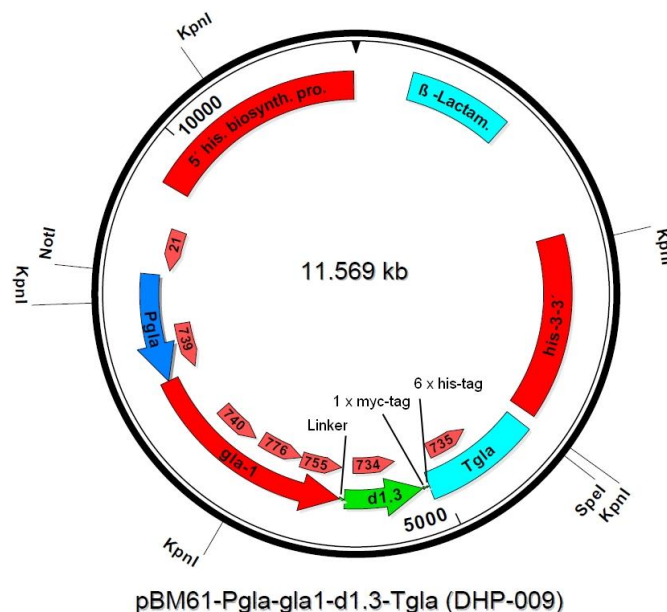


Abb. 6.10: Transformationsplasmid DHP-009 (pBM61-Pgla-gla1-d1.3-Tgla) für die Integration einer Expressionskassette am *his-3*-Locus unter der Kontrolle des *gla-1*-Promotors. Für die Erzeugung des Plasmids wurde zunächst der DNA-Abschnitt *Pgla-gla1-d1.3-Tgla* mit den Restriktionsenzymen *NotI*/*SpeI* (und *MfeI*) aus dem Plasmid DHP-007 herausgeschnitten und in den Vektor pBM61 ligiert. Für eine Überprüfung von DHP-009 wurde eine Testrestriktion mit *KpnI* durchgeführt. Anschließend wurde eine Sequenzierung durchgeführt mit den Primern 21, 739, 740, 776, 755, 734 und 735. Dabei wurden keine Fehler festgestellt, die Sequenz ist korrekt.

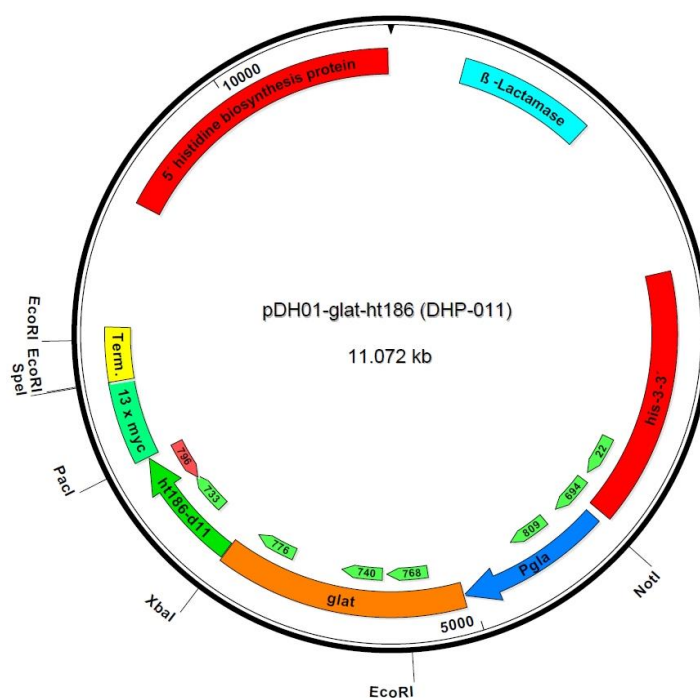


Abb. 6.11. Modulares Transformationsplasmid DHP-011 (pDH01-glat-ht186) für die Integration einer Expressionskassette am *his-3*-Locus unter der Kontrolle des *gla-1*-Promotors. Für die Erzeugung des Plasmids wurde zunächst der DNA-Abschnitt *Pgla-glat-ht186* mittels rekombinanter Hefeklonierung zusammengesetzt. Nach einer anschließenden PCR mit den Primern 694 und 796 wurde der Abschnitt mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *PacI* geschnitten und in den Vektor pMF276 ligiert (ebenfalls mit *NotI* und *PacI* geschnitten). Für eine Überprüfung von DHP-011 wurde eine Testrestriktion mit *EcoRI* durchgeführt. Anschließend wurde eine Sequenzierung durchgeführt mit den Primern 22, 809, 768, 740, 776 und 733. Dabei wurden keine Fehler festgestellt, die Sequenz ist korrekt.

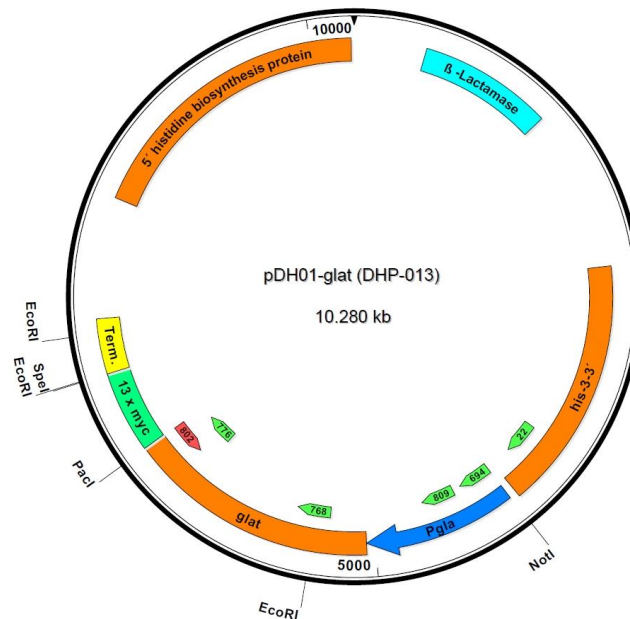


Abb. 6.12: Modulares Transformationsplasmid DHP-013 (pDH01-glat) für die Integration einer Expressionskassette am *his-3*-Locus unter der Kontrolle des *gla-1*-Promotors. Für die Erzeugung des Plasmids wurde zunächst der DNA-Abschnitt *Pgla-gla_i* mittels PCR mit genomischer DNA als Template amplifiziert (Primerpaar 694/802), mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *PacI* geschnitten und in den Vektor pMF276 ligiert (ebenfalls mit *NotI* und *PacI* geschnitten). Für eine Überprüfung von DHP-013 wurde eine Testrestriktion mit *EcoRI* durchgeführt. Anschließend wurde eine Sequenzierung durchgeführt mit den Primern 22, 809, 768 und 776. Dabei wurden keine Fehler festgestellt, die Sequenz ist korrekt.

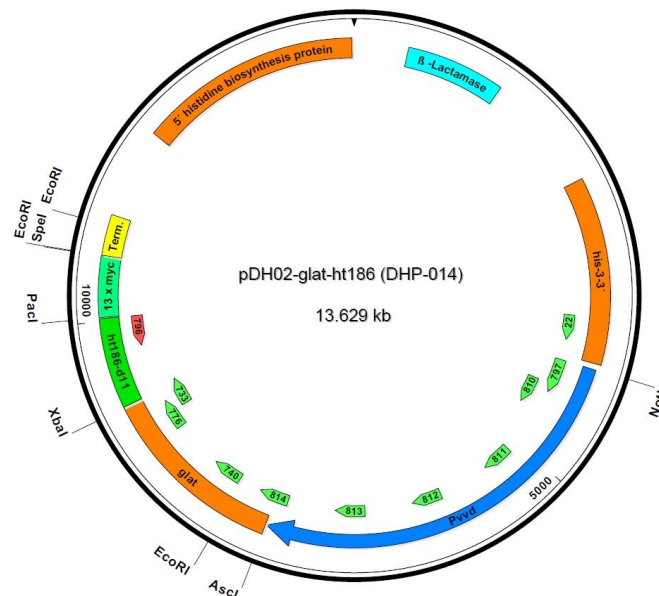


Abb. 6.13: Modulares Transformationsplasmid DHP-014 (pDH02-glat-ht186) für die Integration einer Expressionskassette am *his-3*-Locus unter der Kontrolle des *vvd*-Promotors. Für die Erzeugung des Plasmids wurde zunächst der DNA-Abschnitt *Pvvd-glat-ht186* mittels rekombinanter Hefeklonierung zusammengesetzt. Nach einer anschließenden PCR mit den Primern 797 und 796 wurde der Abschnitt mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *PacI* geschnitten und in den Vektor pMF276 ligiert (ebenfalls mit *NotI* und *PacI* geschnitten). Eine Sequenzanalyse von DHP-014 hatte vorher die Richtigkeit der Sequenz bestätigt. Für eine Überprüfung von DHP-014 wurde eine Testrestriktion mit *EcoRI* durchgeführt. Anschließend wurde eine Sequenzierung durchgeführt mit den Primern 22, 810, 811, 812, 813, 814, 740, 776 und 733. Dabei wurden Basenaustausche an den Positionen 1217, 1256 und 1951 in der Promotorregion festgestellt. Da sich diese jedoch ca. 1600 bp vor dem Translationsstart befinden, wurde das Plasmid weiterverwendet. Es wird nicht davon ausgegangen, dass diese Basenaustausche zu Problemen in der Transkription führen.

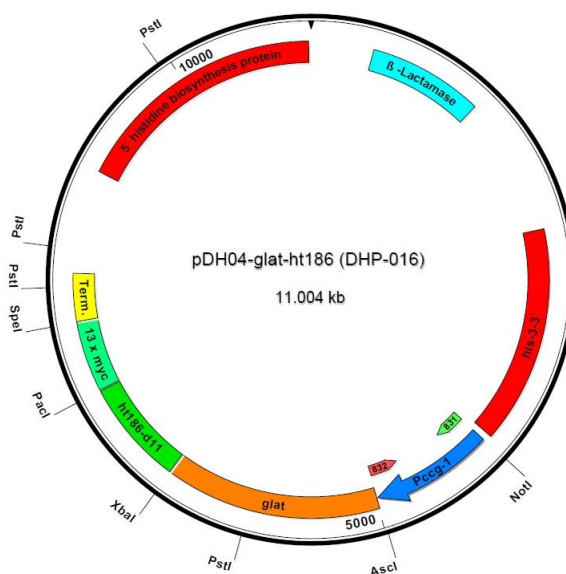


Abb. 6.14: Modulares Transformationsplasmid DHP-016 (pDH04-glat-ht186) für die Integration einer Expressionskassette am *his-3*-Locus unter der Kontrolle des *ccg-1*-Promotors. Für die Erzeugung des Plasmids wurde zunächst der *ccg-1*-Promotor mittels PCR mit dem Plasmid pMF272 als Template amplifiziert (Primerpaar 831/832), mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *AscI* geschnitten und in den Vektor DHP-014 ligiert (ebenfalls mit *NotI* und *AscI* geschnitten). Eine Sequenzanalyse von DHP-014 hatte vorher die Richtigkeit der Sequenz bestätigt. Für eine Überprüfung von DHP-016 wurde eine Testrestriktion mit *PstI* durchgeführt. Eine weitere Sequenzierung erfolgte danach nicht mehr.

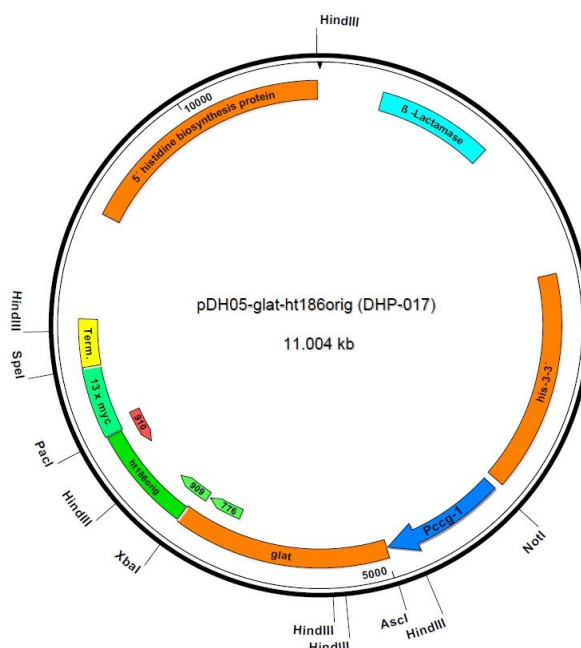


Abb. 6.15: Modulares Transformationsplasmid DHP-017 (pDH05-glat-ht186orig) für die Integration einer Expressionskassette am *his-3*-Locus unter der Kontrolle des *ccg-1*-Promotors. Das *ht186-d11*-Gen ist in diesem Fall nicht Codon-optimiert und weist daher noch die humane Sequenz auf. Für die Erzeugung des Plasmids wurde zunächst das *ht186orig*-Gen mittels PCR mit dem Vektor pOPE101-ht186-d11 als Template amplifiziert (Primerpaar 909/910), mit den Restriktionsenzymen *XbaI* und *PacI* geschnitten und in den Vektor DHP-016 ligiert (ebenfalls mit *XbaI* und *PacI* geschnitten). Eine Sequenzanalyse von DHP-016 hatte vorher die Richtigkeit der Sequenz bestätigt. Für eine Überprüfung von DHP-017 wurde eine Testrestriktion mit *HindIII* durchgeführt. Eine weitere Sequenzierung erfolgte danach nicht nur noch mit den Primern 909 und 910. Dabei wurden keine Fehler festgestellt, die Sequenz ist korrekt.

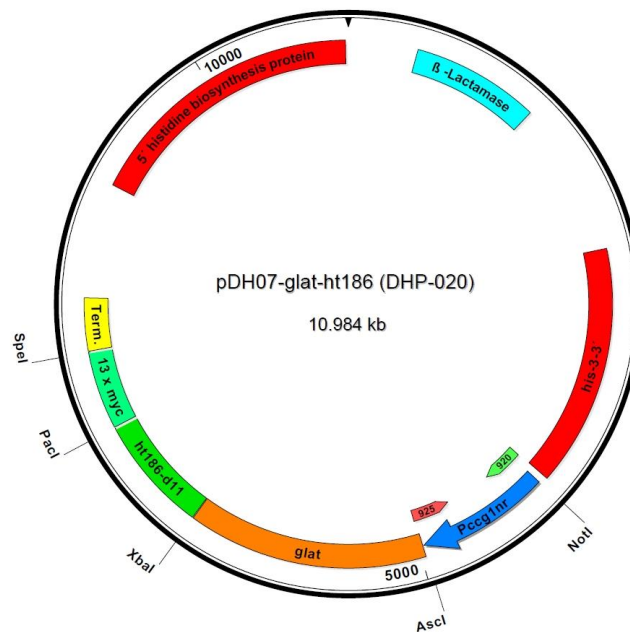


Abb. 6.16: Modulares Transformationsplasmid DHP-020 (pDH07-glat-ht186) für die Integration einer Expressionskassette am *his-3*-Locus unter der Kontrolle des *cpg1nr*-Promotors. Für die Erzeugung des Plasmids wurde zunächst der neuartige Promotor *Pccg1nr* mittels rekombinanter Hefeklonierung zusammengesetzt. Nach einer anschließenden PCR mit den Primern 920 und 925 wurde der Abschnitt mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *AscI* geschnitten und in den Vektor DHP-016 ligiert (ebenfalls mit *NotI* und *AscI* geschnitten). Eine Sequenzanalyse von DHP-016 hatte vorher die Richtigkeit der Sequenz bestätigt. Für eine Überprüfung von DHP-020 wurde eine Testrestriktion mit *AscI/NotI* durchgeführt. Es wurde keine weitere Sequenzierung mehr durchgeführt.

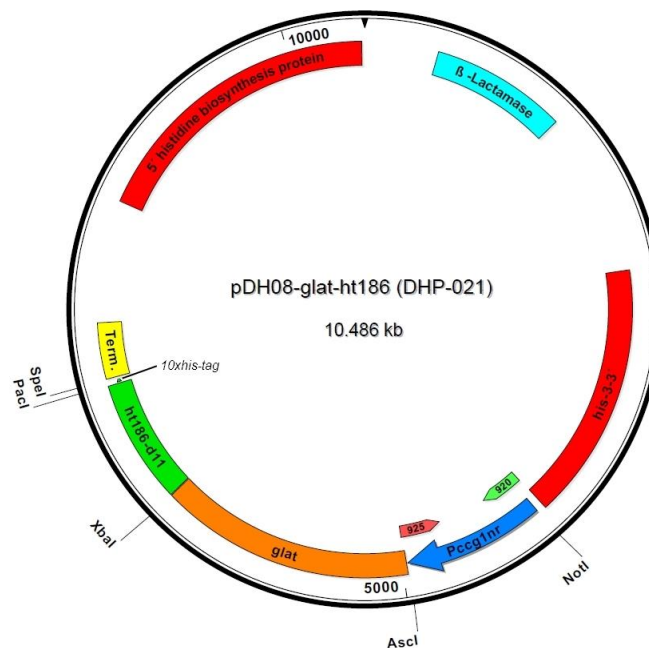


Abb. 6.17: Modulares Transformationsplasmid DHP-020 (pDH07-glat-ht186) für die Integration einer Expressionskassette am *his-3*-Locus unter der Kontrolle des *cpg1nr*-Promotors. Dieser Vektor enthält einen *his10-tag* anstatt des *13xmyc-tags*. Für die Erzeugung des Plasmids wurde zunächst der neuartige Promotor *Pccg1nr* mittels rekombinanter Hefeklonierung zusammengesetzt. Nach einer anschließenden PCR mit den Primern 920 und 925 wurde der Abschnitt mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *AscI* geschnitten und in den Vektor FU06 (Masterarbeit Felix Umrath, pMF276-*pccg-1-glat-bpti-10xhis*) ligiert (ebenfalls mit *NotI* und *AscI* geschnitten). Für eine Überprüfung von DHP-021 wurde eine Testrestriktion mit *AscI/NotI* durchgeführt. Es wurde keine weitere Sequenzierung mehr durchgeführt.

6.3 Bestätigung von erzeugten Stämmen

6.3.1 Transformierbare Stämme

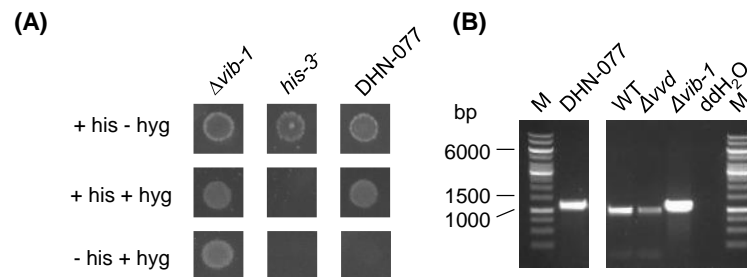


Abb. 6.18: Spotassay (A) und PCR-Nachweis (B) für DHN-077 (*his-3*, $\Delta vib-1$, *mat a*) nach der Kreuzung der Stämme DHN-010 ($\Delta vib-1$, *mat A*) und N1-04 (*his-3*, *mat a*). (A) Für den Spotassay wurden Sporensuspensionen auf BDES-Platten mit Kombinationen aus Histidin (his) und Hygromycin (hyg) ausgetropft und für 2 Tage bei 30 °C inkubiert. Der gesuchte Stamm war Hygromycin-resistent und Histidin-auxotroph. (B) Für den PCR-Nachweis wurde genomische DNA als Template und die Primer 727 und 317 verwendet. Die Anlagerungstemperatur der Primer betrug 58 °C, die Elongationszeit 1:30 min bei Verwendung der DreamTaq-Polymerase. Das erwartete PCR-Amplifikat hatte eine Länge von 1194 bp. Als Kontrollen wurde genomische DNA des Wildtyps (WT, N1-01, Negativkontrolle), eines Δvvd -Stammes (enthält ebenfalls die hph-Kassette, Negativkontrolle), $\Delta vib-1$ (Positivkontrolle) sowie ddH₂O eingesetzt.

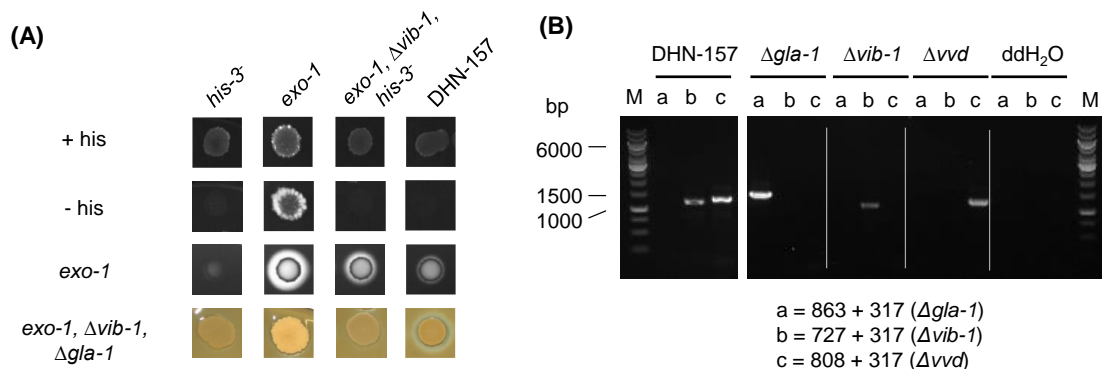


Abb. 6.19: Spotassay (A) und PCR-Nachweis (B) für DHN-157 (*his-3*, $\Delta vib-1$, Δvvd , *exo-1*, *mat a*) nach der Kreuzung der Stämme DHN-148 ($\Delta gla-1$, $\Delta vib-1$, Δvvd , *mat A*) und DHN-137 (*his-3*, *exo-1*, *mat a*). (A) Für den Spotassay wurden Sporensuspensionen auf BDES-Platten mit und ohne Histidin (his) ausgetropft und für 2 Tage bei 30 °C inkubiert. Für die Ermittlung von *exo-1* und *exo-1* $\Delta vib-1$ $\Delta gla-1$ wurden spezielle Platten verwendet. Der gesuchte Stamm war Histidin-auxotroph und sollte einen signifikanten Abbauhof nur im *exo-1*-Test aufzeigen. (B) Für den PCR-Nachweis wurde genomische DNA als Template und die Primer 863/317 ($\Delta gla-1$), 727/317 ($\Delta vib-1$) und 808/317 (Δvvd), verwendet. Die Anlagerungstemperatur der Primer betrug 70 °C, die Elongationszeit 2:00 min bei Verwendung der DreamTaq-Polymerase. Die erwarteten PCR-Amplifikate hatten eine Länge von 1328 bp ($\Delta gla-1$), 1194 bp ($\Delta vib-1$) und 1284 bp (Δvvd). Als Kontrollen wurde genomische DNA der drei Deletionsmutanten sowie ddH₂O eingesetzt.

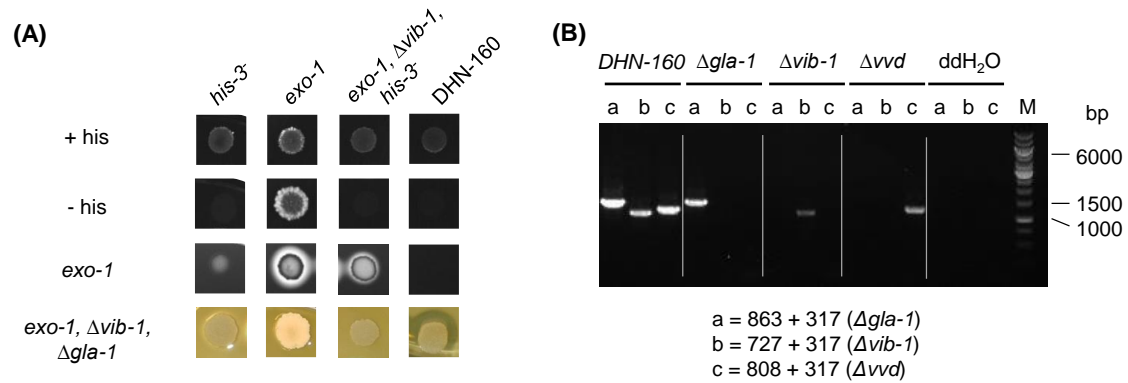


Abb. 6.20: Spotassay (A) und PCR-Nachweis (B) für DHN-160 (*his-3*, *Δvib-1*, *Δvvd*, *Δgla-1*, *exo-1*, *mat a*) nach der Kreuzung der Stämme DHN-148 (*Δgla-1*, *Δvib-1*, *Δvvd*, *mat A*) und DHN-137 (*his-3*, *exo-1*, *mat a*). (A) Für den Spotassay wurden Sporensuspensionen auf BDES-Platten mit und ohne Histidin (his) ausgetropft und für 2 Tage bei 30 °C inkubiert. Für die Ermittlung von *exo-1* und *exo-1 Δvib-1 Δgla-1* wurden spezielle Platten verwendet. Der gesuchte Stamm war Histidin-auxotroph und sollte einen Abbauhof auf beiden Spezialplatten aufzeigen. (B) Für den PCR-Nachweis wurde genomische DNA als Template und die Primer 863/317 (*Δgla-1*), 727/317 (*Δvib-1*) und 808/317 (*Δvvd*), verwendet. Die Anlagerungstemperatur der Primer betrug 70 °C, die Elongationszeit 2:00 min bei Verwendung der DreamTaq-Polymerase. Die erwarteten PCR-Amplifikate hatten eine Länge von 1328 bp (*Δgla-1*), 1194 bp (*Δvib-1*) und 1284 bp (*Δvvd*). Als Kontrollen wurde genomische DNA der drei Deletionsmutanten sowie ddH₂O eingesetzt.

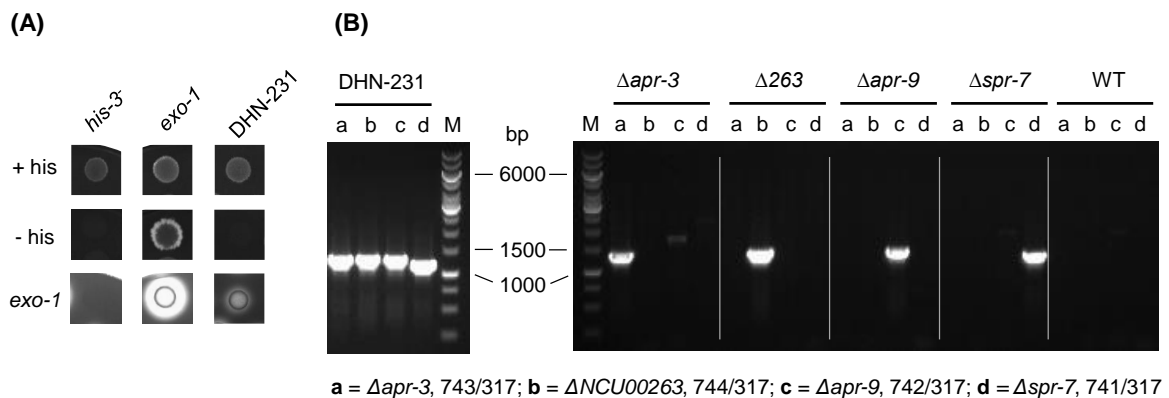


Abb. 6.21: Spotassay (A) und PCR-Nachweis (B) für DHN-231 (*his-3*, *Δapr-3*, *Δapr-9*, *Δspr-7*, *ΔNCU00263*, *exo-1*, *mat a*) nach der Kreuzung der Stämme DHN-228 (*Δapr-3*, *Δapr-9*, *Δspr-7*, *ΔNCU00263*, *mat A*) und DHN-224 (*his-3*, *Δapr-3*, *exo-1*, *mat a*). (A) Für den Spotassay wurden Sporensuspensionen auf BDES-Platten mit und ohne Histidin (his) ausgetropft und für 2 Tage bei 30 °C inkubiert. Für die Ermittlung von *exo-1* wurden spezielle *exo-1*-Platten verwendet. Der gesuchte Stamm war Histidin-auxotroph und sollte einen Abbauhof auf der Spezialplatte aufzeigen. (B) Für den PCR-Nachweis wurde genomische DNA als Template und die Primer 743/317 (*Δapr-3*), 744/317 (*ΔNCU00263*), 742/317 (*Δapr-9*) und 741/317 (*Δspr-7*) verwendet. Die Anlagerungstemperatur der Primer betrug 58 °C, die Elongationszeit 1:40 min bei Verwendung der DreamTaq-Polymerase. Die erwarteten PCR-Amplifikate hatten eine Länge von 1326 bp (*Δapr-3*), 1336 bp (*ΔNCU00263*), 1318 bp (*Δapr-9*) und 1193 bp (*Δspr-7*). Als Kontrollen wurde genomische DNA der vier Deletionsmutanten sowie des Wildtyps N1-01 (WT) eingesetzt.

6.3.2 Produktionsstämme

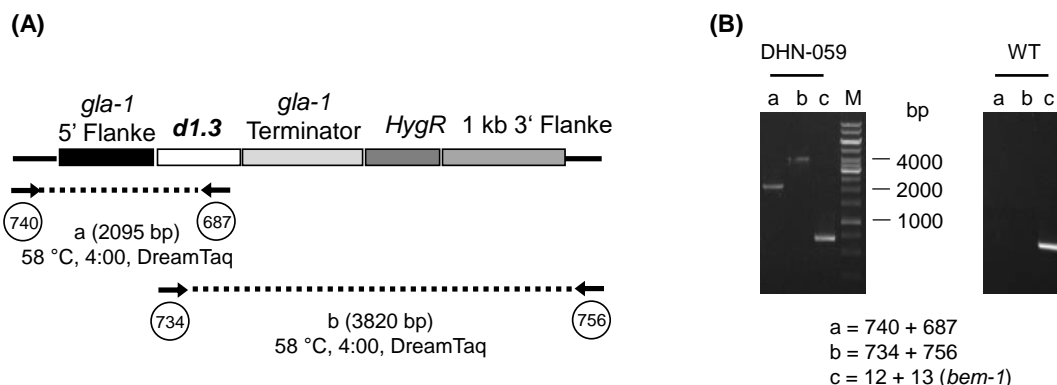


Abb. 6.22: PCR-Nachweis der Transformante DHN-059 (*gla-1::gla-1-d1.3-Tgla-hph*, Δ *mus-51*, *mat a*) nach Einzelsporisolierung. Für die Erzeugung des Stammes wurde der Empfängerstamm N1-08 (Δ *mus-51*, *mat a*) mit DNA transformiert, welche aus dem Plasmid DHP-005 über das Restriktionsenzym *NotI* herausgeschnitten wurde. Nach Selektion auf Hygromycin-haltigen Medium wurde die genomische DNA von ausgewählten Transformanten als Template mit den Primerpaaren 740/687 und 734/756 für eine PCR eingesetzt. Eine schematische Darstellung des Nachweisprinzips ist Block (A) zu entnehmen. Zusätzlich wurde die Qualität der genomischen DNA mit dem Primerpaar 12/13 kontrolliert. Positive Transformanten wurden für eine Einzelsporisolierung verwendet (zwei Durchgänge, Selektion auf Hygromycin). Danach wurde eine abschließende PCR auf Vorhandensein der Expressionskassette durchgeführt (B). Primerpaare, Anlagerungstemperaturen, Elongationszeiten, die verwendete Polymerase und erwartete Bandengrößen sind den jeweiligen Abbildungen zu entnehmen. Erwartete Bandengröße waren für das Primerpaar 12/13 waren 649 bp.

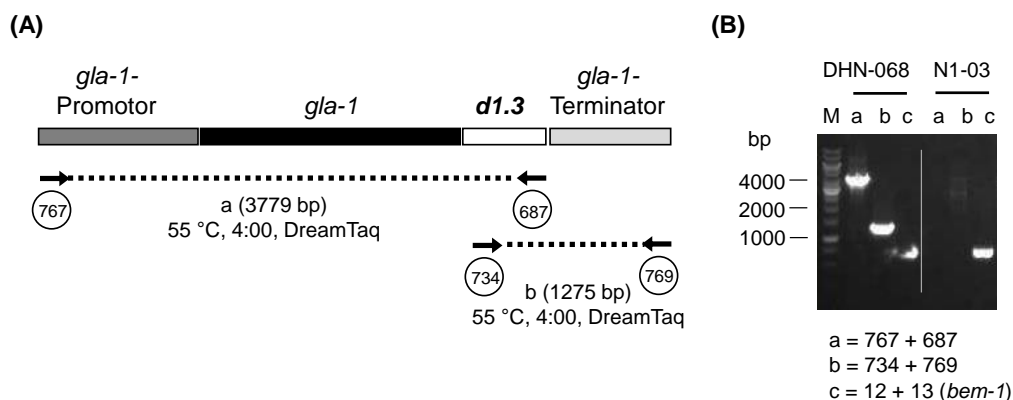


Abb. 6.23: PCR-Nachweis der Transformante DHN-068 (*his-3⁺::Pgla-gla-1-d1.3-Tgla*, *mat A*) nach Einzelsporisolierung. Für die Erzeugung des Stammes wurde der Empfängerstamm N1-03 (*his-3⁻*, *mat A*) mit dem Plasmid DHP-009 transformiert. Nach Selektion auf Histidin-freiem Minimalmedium wurde die genomische DNA von ausgewählten Transformanten als Template mit den Primerpaaren 767/687 und 734/769 für eine PCR eingesetzt. Eine schematische Darstellung des Nachweisprinzips ist Block (A) zu entnehmen. Zusätzlich wurde die Qualität der genomischen DNA mit dem Primerpaar 12/13 kontrolliert. Positive Transformanten wurden für eine Einzelsporisolierung verwendet (zwei Durchgänge, Selektion auf Histidin-freiem Minimalmedium). Danach wurde eine abschließende PCR auf Vorhandensein der Expressionskassette durchgeführt (B). Primerpaare, Anlagerungstemperaturen, Elongationszeiten, die verwendete Polymerase und erwartete Bandengrößen sind den jeweiligen Abbildungen zu entnehmen. Erwartete Bandengröße waren für das Primerpaar 12/13 waren 649 bp.

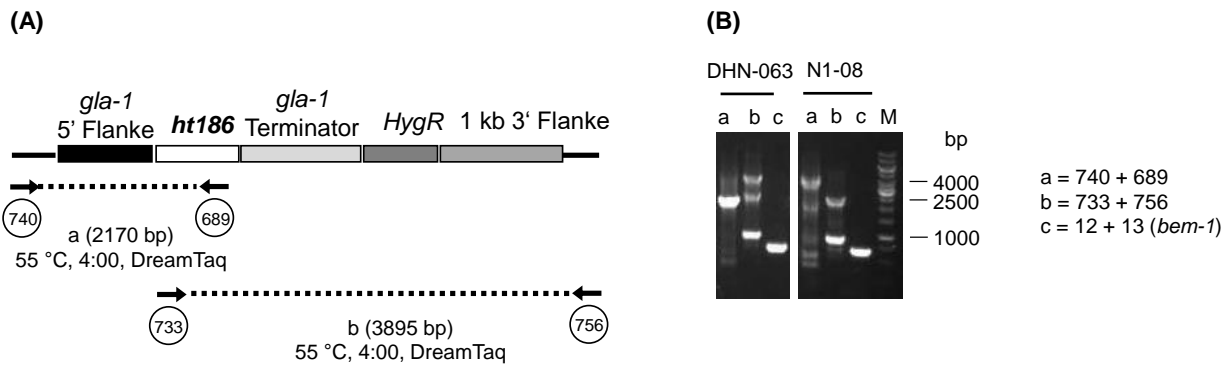


Abb. 6.24: PCR-Nachweis der Transformante DHN-063 (*gla-1::gla-1-ht186-d11-Tgla-hph*, Δ *mus-51*, *mat a*) nach Einzelsporisolierung. Für die Erzeugung des Stammes wurde der Empfängerstamm N1-08 (Δ *mus-51*, *mat a*) mit DNA transformiert, welche aus dem Plasmid DHP-006 über das Restriktionsenzym *NorI* herausgeschnitten wurde. Nach Selektion auf Hygromycin-haltigen Medium wurde die genomische DNA von ausgewählten Transformanten als Template mit den Primerpaaren 740/689 und 733/756 für eine PCR eingesetzt. Eine schematische Darstellung des Nachweisprinzips ist Block (A) zu entnehmen. Zusätzlich wurde die Qualität der genomischen DNA mit dem Primerpaar 12/13 kontrolliert. Positive Transformanten wurden für eine Einzelsporisolierung verwendet (zwei Durchgänge, Selektion auf Hygromycin). Danach wurde eine abschließende PCR auf Vorhandensein der Expressionskassette durchgeführt (B). Primerpaare, Anlagerungstemperaturen, Elongationszeiten, die verwendete Polymerase und erwartete Bandengrößen sind den jeweiligen Abbildungen zu entnehmen. Erwartete Bandengröße waren für das Primerpaar 12/13 waren 649 bp.

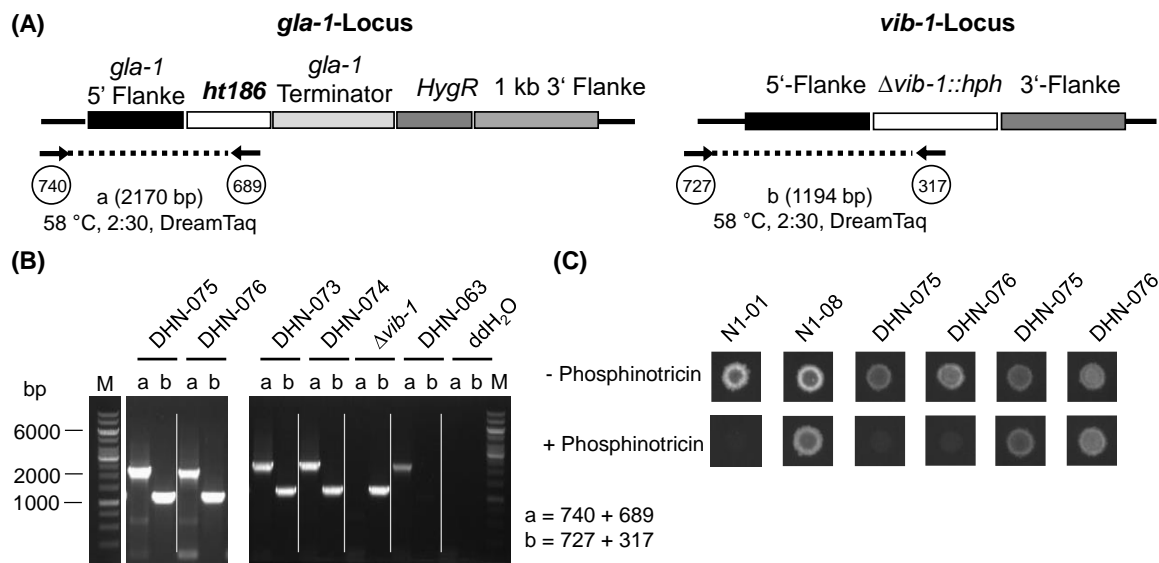


Abb. 6.25: Bestätigung der Stämme DHN-073/74 (*gla-1::gla-1-ht186-d11-Tgla-hph*, Δ *vib-1*, Δ *mus-51*, *mat A*) und DHN-075/76 (*gla-1::gla-1-ht186-d11-Tgla-hph*, Δ *vib-1*, *mat A*) nach der Kreuzung der Stämme DHN-063 (*gla-1::gla-1-ht186-d11-Tgla-hph*, Δ *mus-51*, *mat a*) und DHN-010 (Δ *vib-1*, *mat A*). Nach Selektion auf Hygromycin-haltigen Medium wurde die genomische DNA von ausgewählten Nachkommen als Template für eine PCR eingesetzt. Eine schematische Darstellung des Nachweisprinzips ist Block (A) zu entnehmen. PCR (B): Primerpaare, Anlagerungstemperaturen, Elongationszeiten, die verwendete Polymerase und erwartete Bandengrößen sind den jeweiligen Abbildungen zu entnehmen. DHN-063 (*gla-1::gla-1-ht186-d11-Tgla-hph*, Δ *mus-51*, *mat a*) wurde als Positivkontrolle verwendet. Für die Überprüfung von Δ *mus-51::bar*⁺ wurde ein Spotassay durchgeführt (C). Dafür wurden Sporensuspensionen auf BDES-Medium mit und ohne Phosphinitricin ausgetropft und für 2 Tage bei 30 °C inkubiert. Wachstum auf beiden Platten zeigt das Vorhandensein von Δ *mus-51::bar*⁺ auf. Kontrollen waren N1-01 (Wildtyp) und N1-08 (Δ *mus-51::bar*⁺).

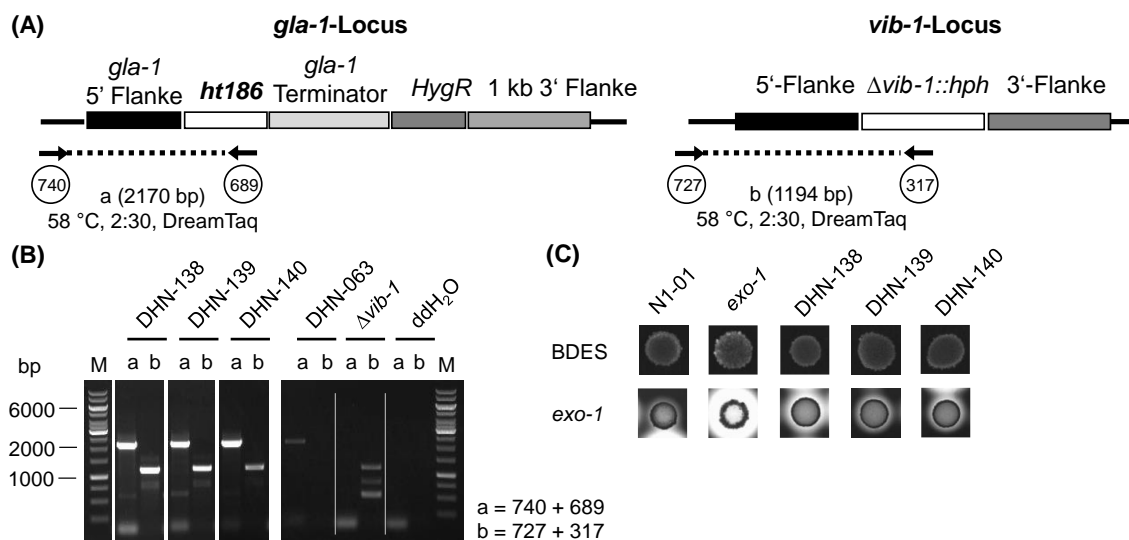


Abb. 6.26: Bestätigung der Stämme DHN-138 (*gla-1::gla-1-ht186-d11-Tgla-hph*, $\Delta vib-1$, *exo-1*, *mat A*) und DHN139/140 (beide *mat a*) nach der Kreuzung der Stämme DHN-075 (*gla-1::gla-1-ht186-d11-Tgla-hph*, $\Delta vib-1$, *mat A*) und DHN-082 (*exo-1*, *mat a*). Nach Selektion auf Hygromycin-haltigen Medium wurde die genomische DNA von ausgewählten Nachkommen als Template mit den Primerpaaren 740/689 und 727/317 eingesetzt. Eine schematische Darstellung des Nachweisprinzips ist Block (A) zu entnehmen. PCR (B): Primerpaare, Anlagerungstemperaturen, Elongationszeiten, die verwendete Polymerase und erwartete Bandengrößen sind den jeweiligen Abbildungen zu entnehmen. Für die Überprüfung auf *exo-1* wurde ein Spotassay durchgeführt (C). Dafür wurden Sporensuspensionen auf spezielle *exo-1*-Platten ausgetropft und für 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Ein Abbauhof deutet auf Vorhandensein von *exo-1* hin. Da bei diesem Test die verwendete Glucoamylase ersetzt ist, ist der Abbau verlangsamt.

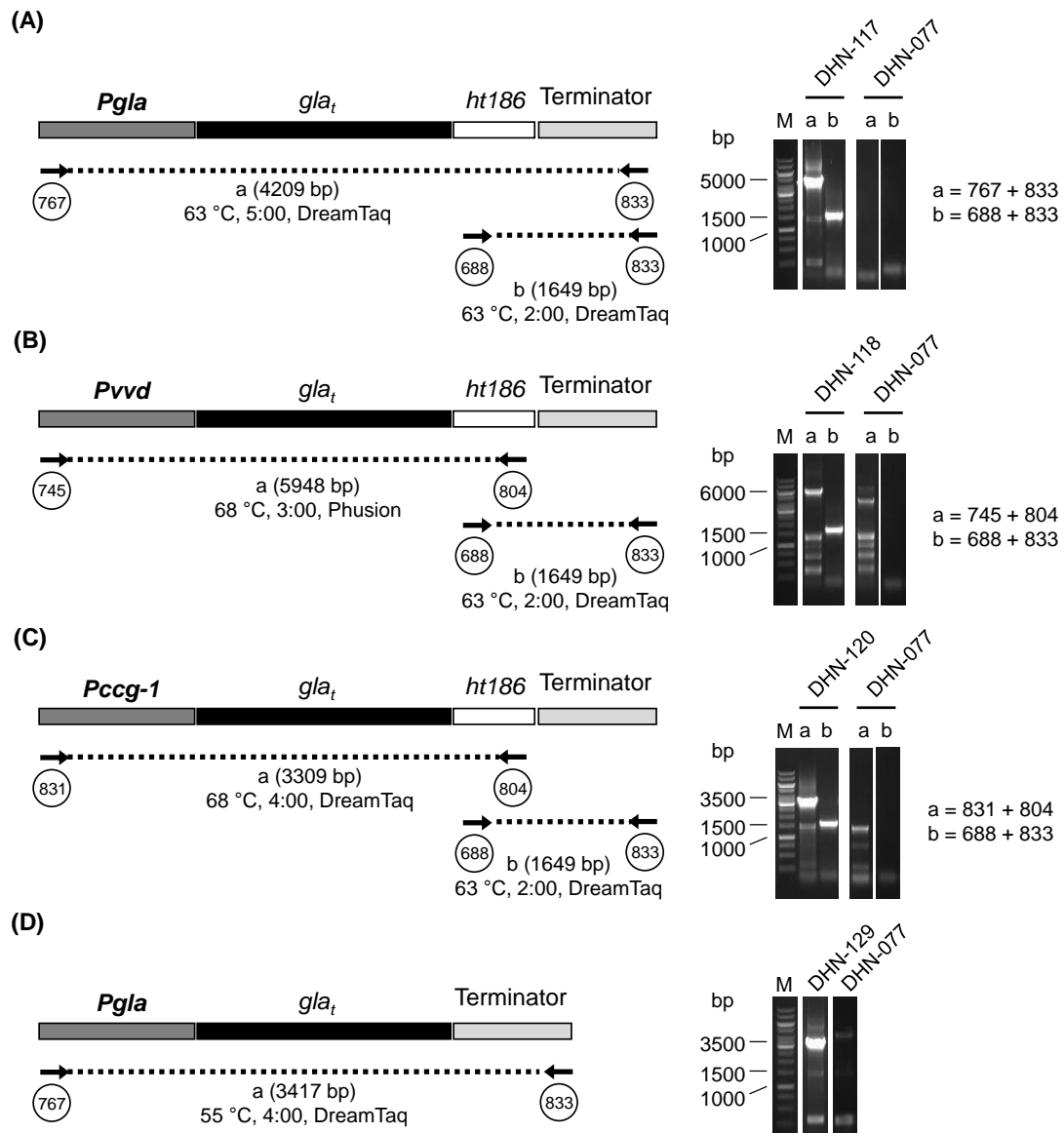


Abb. 6.27: PCR-Nachweis der Transformanten DHN-117 (A), DHN-118 (B), DHN-120 (C) und DHN-129 (D) nach Einzelsporisolation. Alle Stämme haben den genetischen Hintergrund $\Delta vib-1$ *mat a*. Am *his-3*-Locus sind verschiedene Expressionskassetten integriert: DHN-117: *his-3⁺::Pgla-glat-ht186-d11-13xmyc* (A); DHN-118: *his-3⁺::Pvvd-glat-ht186-d11-13xmyc* (B); DHN-120: *his-3⁺::Pccg-1-glat-ht186-d11-13xmyc* (C); DHN-129, *his-3⁺::Pgla-glat-13xmyc* (D). Für die Erzeugung der Stämme wurde der Empfängerstamm DHN-077 (*his-3⁻*, $\Delta vib-1$, *mat a*) mit den Plasmiden DHP-011 (A), DHP-014 (B), DHP-016 (C) oder DHP-013 (D) transformiert. Nach Selektion auf Histidin-freiem Minimalmedium wurde die genomische DNA von ausgewählten Transformanten als Template für eine PCR eingesetzt. Eine schematische Darstellung des Nachweisprinzips ist dem jeweiligen Block zu entnehmen. Positive Transformanten wurden für eine Einzelsporisolation verwendet (zwei Durchgänge, Selektion auf Histidin-freiem Minimalmedium). Danach wurde eine abschließende PCR auf Vorhandensein der Expressionskassette durchgeführt. Primerpaare, Anlagerungstemperaturen, Elongationszeiten, die verwendete Polymerase und erwartete Bandengrößen sind den jeweiligen Abbildungen zu entnehmen.

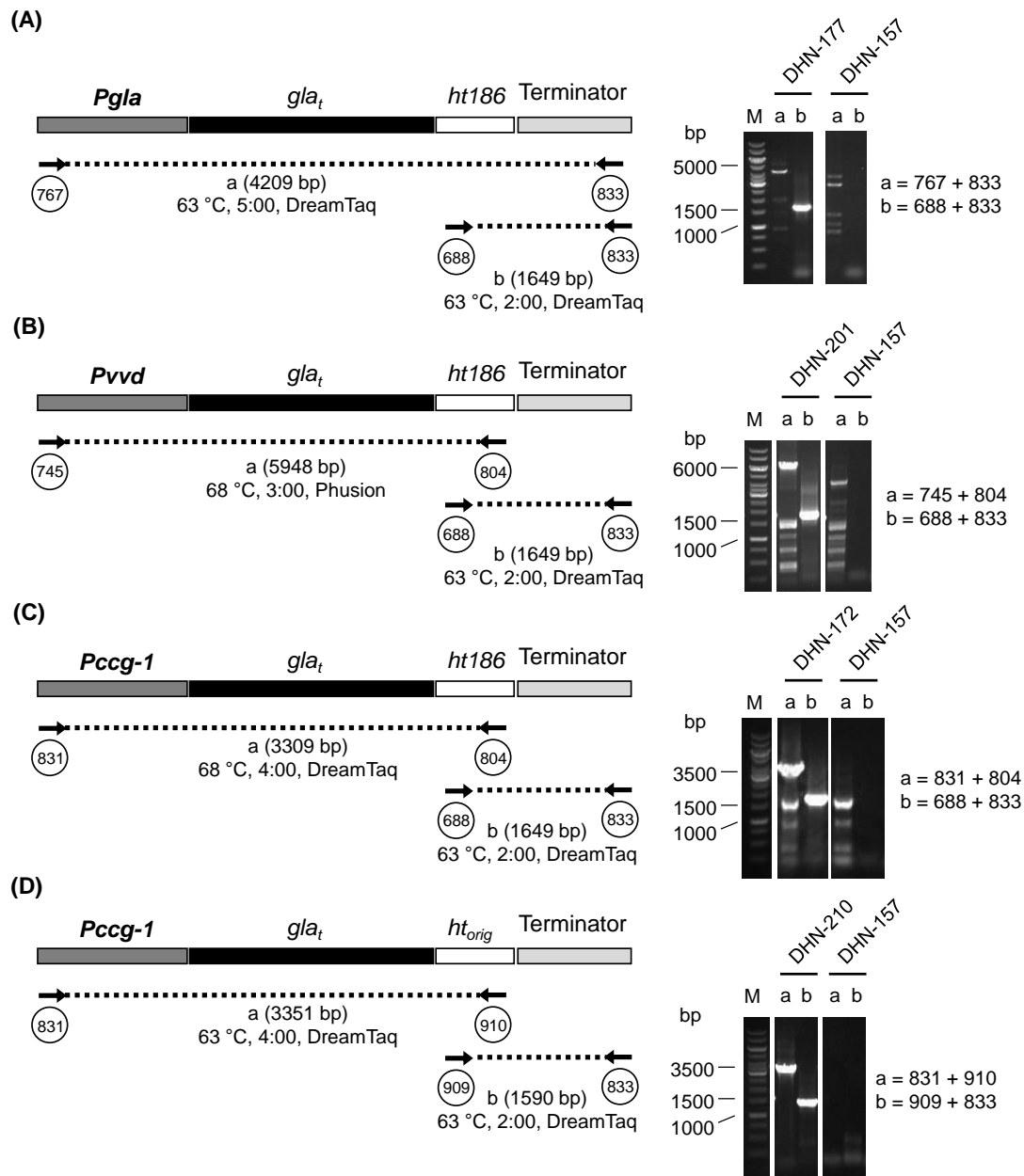


Abb. 6.28: PCR-Nachweis der Transformanten DHN-177 (A), DHN-201 (B), DHN-172 (C) und DHN-210 (D) nach Einzelsporisolation. Alle Stämme haben den genetischen Hintergrund $\Delta vib-1 \Delta vvd \text{ } \Delta exo-1 \text{ } \Delta mat \text{ } a$. Am *his-3*-Locus sind verschiedene Expressionskassetten integriert: DHN-177: *his-3⁺::PglA-glat-ht186-d11-13xmyc* (A); DHN-201: *his-3⁺::PvvD-glat-ht186-d11-13xmyc* (B); DHN-172: *his-3⁺::Pccg-1-glat-ht186-d11-13xmyc* (C); DHN-210: *his-3⁺::Pccg-1-glat-htorig-13xmyc* (D). Für die Erzeugung der Stämme wurde der Empfängerstamm DHN-157 (*his-3⁻, Δvib-1, Δvvd, exo-1, mat a*) mit den Plasmiden DHP-011 (A), DHP-014 (B), DHP-016 (C) oder DHP-017 (D) transformiert. Nach Selektion auf Histidin-freiem Minimalmedium wurde die genomische DNA von ausgewählten Transformanten als Template für eine PCR eingesetzt. Eine schematische Darstellung des Nachweisprinzips ist dem jeweiligen Block zu entnehmen. Positive Transformanten wurden für eine Einzelsporisolation verwendet (zwei Durchgänge, Selektion auf Histidin-freiem Minimalmedium). Danach wurde eine abschließende PCR auf Vorhandensein der Expressionskassette durchgeführt. Primerpaare, Anlagerungstemperaturen, Elongationszeiten, verwendete Polymerase und erwartete Bandengrößen sind den jeweiligen Abbildungen zu entnehmen. Der Stamm DHN-169 stammt aus einer Transformation mit dem Plasmid DHP-016, es handelt sich jedoch um eine negative Transformante (keine PCR-Bestätigung).

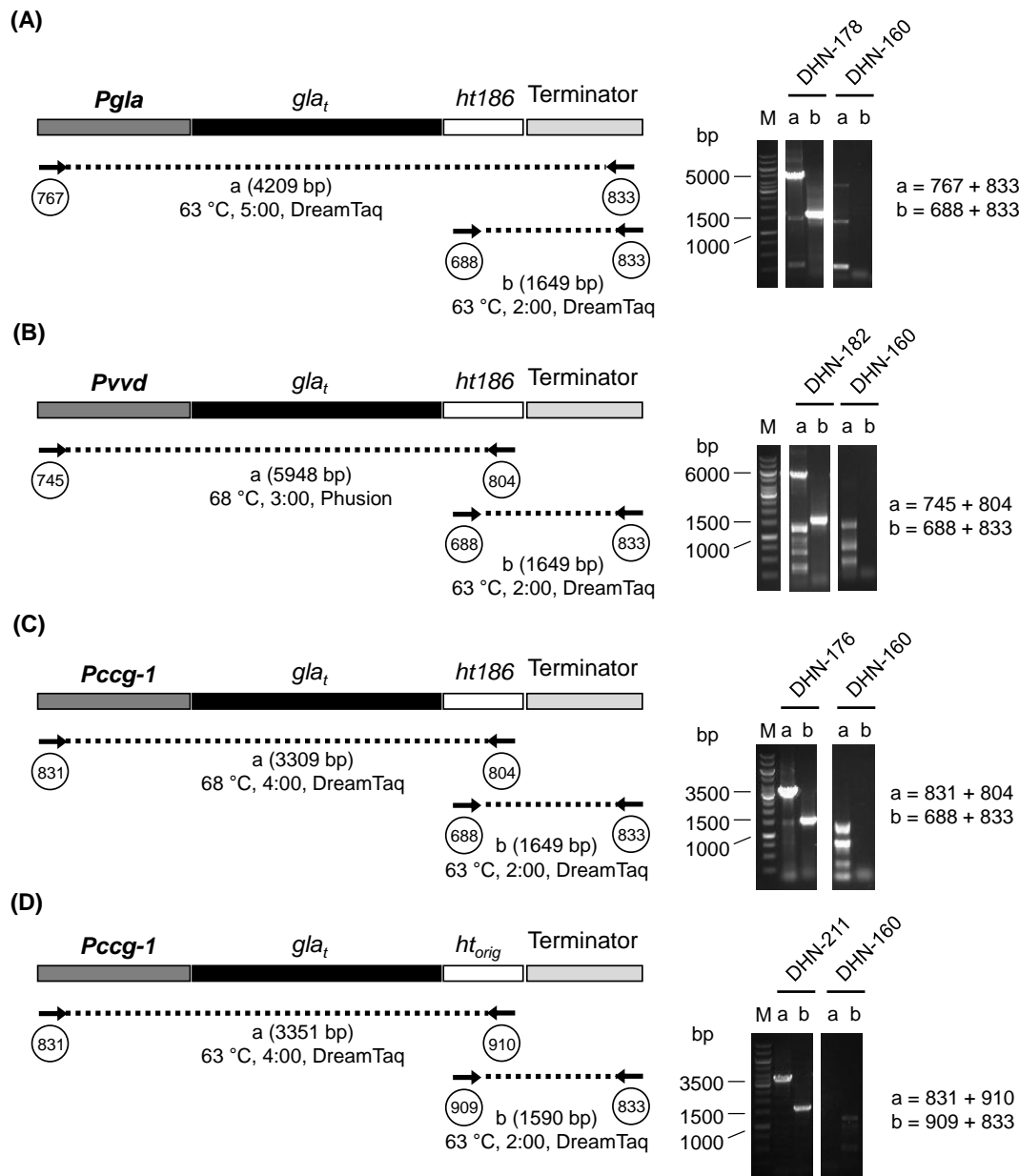


Abb. 6.29: PCR-Nachweis der Transformanten DHN-178 (A), DHN-182 (B), DHN-176 (C) und DHN-211 (D) nach Einzelsporisolierung. Alle Stämme haben den genetischen Hintergrund $\Delta vib-1 \Delta vvd \Delta gla-1 exo-1 mat a$. Am *his-3*-Locus sind verschiedene Expressionskassetten integriert: DHN-178: *his-3⁺::PglA-glat-ht186-d11-13xmyc* (A); DHN-182: *his-3⁺::PvvD-glat-ht186-d11-13xmyc* (B); DHN-176: *his-3⁺::Pccg-1-glat-ht186-d11-13xmyc* (C); DHN-211, *his-3⁺::Pccg-1-glat-htorig-13xmyc* (D). Für die Erzeugung der Stämme wurde der Empfängerstamm DHN-160 (*his-3⁻*, $\Delta vib-1$, Δvvd , $\Delta gla-1$, *exo-1*, *mat a*) mit den Plasmiden DHP-011 (A), DHP-014 (B), DHP-016 (C) oder DHP-017 (D) transformiert. Nach Selektion auf Histidin-freiem Minimalmedium wurde die genomische DNA von ausgewählten Transformanten als Template für eine PCR eingesetzt. Eine schematische Darstellung des Nachweisprinzips ist dem jeweiligen Block zu entnehmen. Positive Transformanten wurden für eine Einzelsporisolierung verwendet (zwei Durchgänge, Selektion auf Histidin-freiem Minimalmedium). Danach wurde eine abschließende PCR auf Vorhandensein der Expressionskassette durchgeführt. Primerpaare, Anlagerungstemperaturen, Elongationszeiten, verwendete Polymerase und erwartete Bandengrößen sind den jeweiligen Abbildungen zu entnehmen. Der Stamm DHN-170 stammt aus einer Transformation mit dem Plasmid DHP-016, es handelt sich jedoch um eine negative Transformante (keine PCR-Bestätigung).

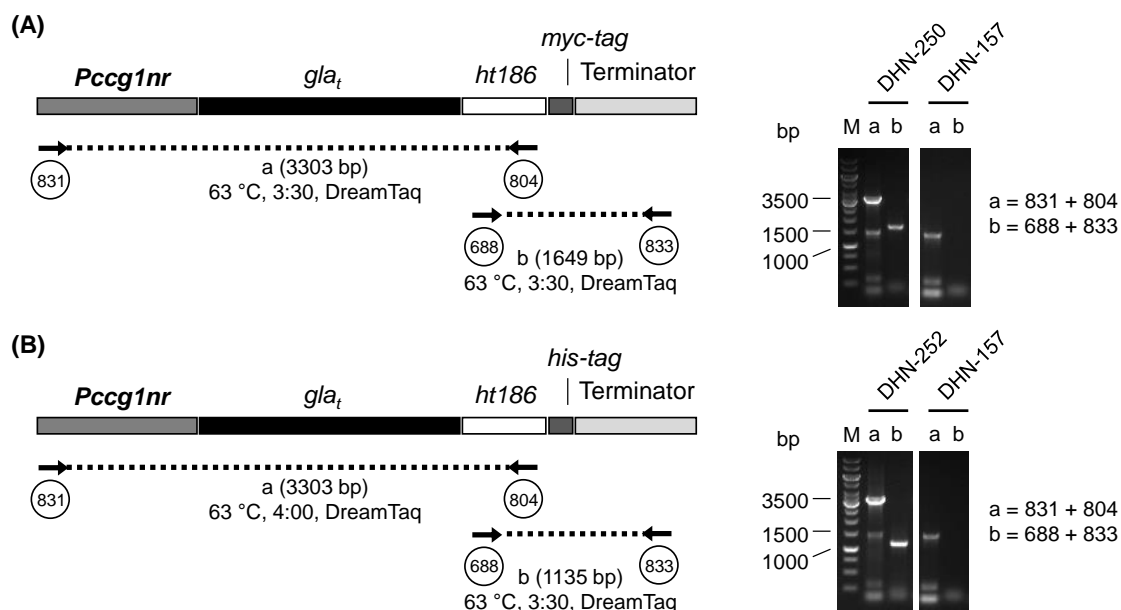


Abb. 6.30: PCR-Nachweis der Transformanten DHN-250 (A) und DHN-252 (B) nach Einzelsporisolierung. Beide Stämme haben den genetischen Hintergrund $\Delta vib-1 \Delta vvd \Delta exo-1 \Delta mat a$. Am *his-3*-Locus sind unterschiedliche Expressionskassetten integriert: DHN-250: *his-3⁺::Pccg1nr-glat-ht186-d11-13xmyc* (A); DHN-252: *Pccg1nr-glat-ht186-d11-10xhis* (B). Für die Erzeugung der Stämme wurde der Empfängerstamm DHN-157 (*his-3⁻*, $\Delta vib-1$, Δvvd , $\Delta exo-1$, $\Delta mat a$) mit den Plasmiden DHP-020 (A) oder DHP-021 (B) transformiert. Nach Selektion auf Histidin-freiem Minimalmedium wurde die genomische DNA von ausgewählten Transformanten als Template für eine PCR eingesetzt. Eine schematische Darstellung des Nachweisprinzips ist dem jeweiligen Block zu entnehmen. Positive Transformanten wurden für eine Einzelsporisolierung verwendet (zwei Durchgänge, Selektion auf Histidin-freiem Minimalmedium). Danach wurde eine abschließende PCR auf Vorhandensein der Expressionskassette durchgeführt. Primerpaare, Anlagerungstemperaturen, Elongationszeiten, verwendete Polymerase und erwartete Bandengrößen sind den jeweiligen Abbildungen zu entnehmen.

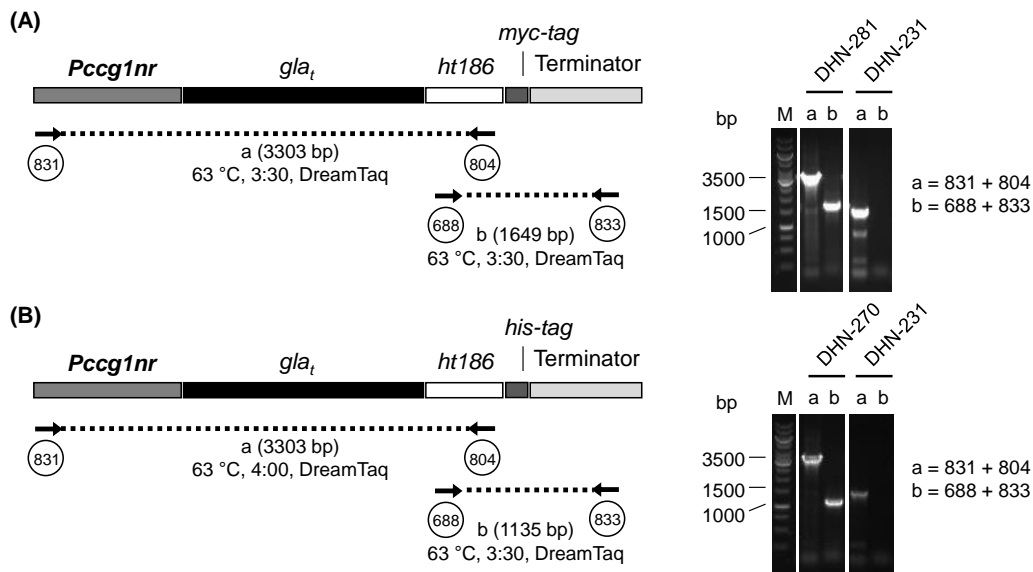


Abb. 6.31: PCR-Nachweis der Transformanten DHN-281 (A) und DHN-270 (B) nach Einzelsporisolierung. Beide Stämme haben den genetischen Hintergrund $\Delta apr-3 \Delta apr-9 \Delta spr-7 \Delta NCU00263 \Delta exo-1 \Delta mat a$. Am *his-3*-Locus sind unterschiedliche Expressionskassetten integriert: DHN-281: *his-3⁺::Pccg1nr-glat-ht186-d11-13xmyc* (A); DHN-270: *Pccg1nr-glat-ht186-d11-10xhis* (B). Für die Erzeugung der Stämme wurde der Empfängerstamm DHN-231 (*his-3⁻*, $\Delta apr-3$, $\Delta apr-9$, $\Delta spr-7$, $\Delta NCU00263$, $\Delta exo-1$, $\Delta mat a$) mit den Plasmiden DHP-020 (A) oder DHP-021 (B) transformiert. Nach Selektion auf Histidin-freiem Minimalmedium wurde die genomische DNA von ausgewählten Transformanten als Template für eine PCR eingesetzt. Eine schematische Darstellung des Nachweisprinzips ist dem jeweiligen Block zu entnehmen. Positive Transformanten wurden für eine Einzelsporisolierung verwendet (zwei Durchgänge, Selektion auf Histidin-freiem Minimalmedium). Danach wurde eine abschließende PCR auf Vorhandensein der Expressionskassette durchgeführt. Primerpaare, Anlagerungstemperaturen, Elongationszeiten, verwendete Polymerase und erwartete Bandengrößen sind den jeweiligen Abbildungen zu entnehmen.

6.3.3 Sonstige Stämme

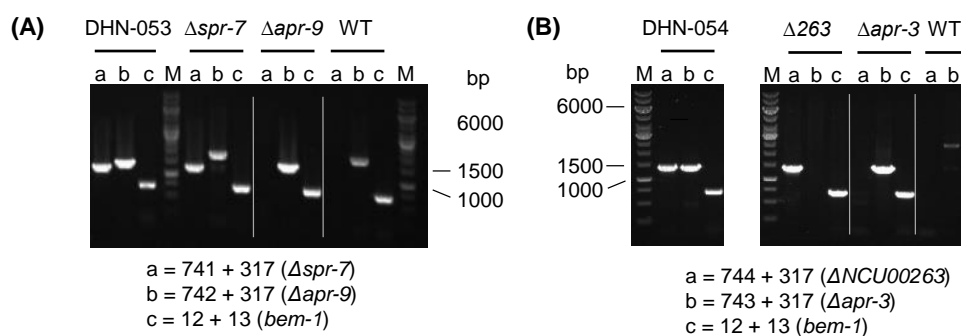


Abb. 6.32: PCR-Nachweis für (A) DHN-053 ($\Delta apr-9$, $\Delta spr-7$, *mat A*) und (B) DHN-054 ($\Delta apr-3$, $\Delta NCU00263$, *mat A*). Für DHN-054 wurden die Stämme DHN-017 ($\Delta spr-7$, *mat A*) und DHN-007 ($\Delta apr-9$, *mat a*) gekreuzt, für DHN-054 waren es die Stämme DHN-012 ($\Delta NCU00263$, *mat A*) und DHN-001 ($\Delta apr-3$, *mat a*). Für den PCR-Nachweis wurde genomische DNA als Template und die Primer 741/317 ($\Delta spr-7$), 742/317 ($\Delta apr-9$) bzw. 744/317 ($\Delta NCU00263$) und 743/317 ($\Delta apr-3$) verwendet. Mit den Primer 12 und 13 wird lediglich kontrolliert, ob die genomische DNA in der korrekten Konzentration eingesetzt wurde. Die Anlagerungstemperatur der Primer betrug 58 °C, die Elongationszeit 1:40 min bei Verwendung der DreamTaq-Polymerase. Die erwarteten PCR-Amplifikate hatten eine Länge von 1193 bp ($\Delta spr-7$) und 1318 bp ($\Delta apr-9$) bzw. 1336 bp ($\Delta NCU00263$) und 1326 bp ($\Delta apr-3$), für die Kontrolle waren es 649 bp (Primerpaar 12/13). Als Kontrollen wurde genomische DNA der vier Deletionsmutanten sowie des Wildtyps N1-01 (WT) eingesetzt.

6.4 Erzeugung von *Pccg1nr* mittels rekombinanter Hefeklonierung

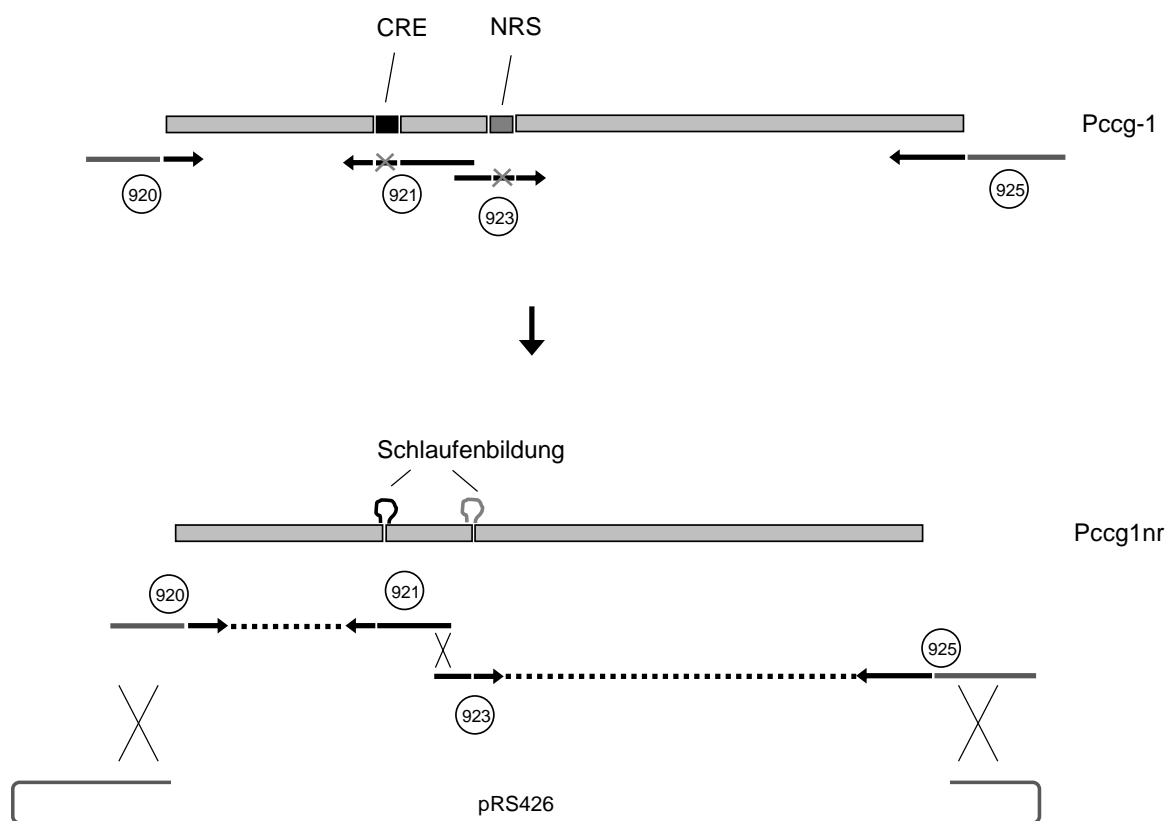


Abb. 6.33: Schematische Darstellung des Prinzips der Erzeugung des nicht-reprimierbaren Promotors *Pccg1nr*. Das eigentliche Prinzip ist die Erzeugung von Primern, welche den zu deletierenden Bereich (CRE bzw. NRS) nicht mehr aufweisen. Bei der Amplifikation (aus dem Plasmid pMF272) entstehen dabei Schleifen mit dem deletierten Bereich. Die Primer enthalten zusätzlich überlappende Bereiche zum Nachbarabschnitt, sodass eine Hefeklonierung durchgeführt werden kann. Nach der Hefeklonierung wurde eine PCR mit den Primern 920 und 925 durchgeführt. Über eine Sequenzierung nach Klonierung in den Vektor pMF272 wurde bestätigt, dass die Deletion erfolgreich war.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|---|
| × g | Erdbeschleunigung |
| °C | Grad Celsius |
| μ | spezifische Wachstumsrate |
| μg | Mikrogramm |
| μL | Mikroliter |
| μM | mikromolar |
| 2×YT-GA | 2 × YT-Medium mit Zusatz von Glucose und Ampicillin |
| AG | Arbeitsgruppe |
| AP | alkalische Phosphatase |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| BCIP | 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat |
| bp | Basenpaare |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| BTM | Biotrockenmasse |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | circa |
| C-Quelle | Kohlenstoffquelle |
| ddH ₂ O | bidestilliertes Wasser |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphate |
| DO | <i>dissolved oxygen</i> |
| ECL | Elektrochemoluminiszenz |
| EDTA | Ethylendiamin-Tetraessigsäure |
| ELISA | <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> |
| FGSC | <i>Fungal Genetic Stock Center</i> |
| g | Gramm |
| GLA-1 | Glucoamylase |
| GLA _t | gekürzte Glucoamylase |
| h | Stunde |
| HPLC | <i>High-performance liquid chromatography</i> |
| HRP | <i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase |
| Ig | Immunoglobulin |
| IMAC | <i>Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography</i> |
| IPTG | Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid |
| kD | Kilodalton |
| L | Liter |
| LB | Luria-Bertani |
| M | molar |

| | |
|---------------------|--|
| mA | Milliampère |
| mg | Milligramm |
| min | Minute |
| mL | Milliliter |
| mM | millimolar |
| MUC-1 | Muzin |
| NBT | Nitroblau-Tetrazoliumchlorid |
| ng | Nanogramm |
| nm | Nanometer |
| OD _{600nm} | optische Dichte bei $\lambda = 600 \text{ nm}$ |
| OTR / | <i>oxygen transfer rate</i> , Sauerstoffaufnahme rate |
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| Q _{CO2} | Kohlenstoffdioxidbildungsrate |
| Q _{O2} | siehe OTR |
| rpm | <i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute |
| RQ | respiratorischer Quotient |
| RT | Raumtemperatur |
| s. | siehe |
| S. | Seite |
| scFv | <i>single chain fragment variable</i> |
| SDS | <i>sodium dodecyl sulfate</i> |
| SDS-PAGE | denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| sek | Sekunde |
| SV | Säulenvolumen |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| TRIS | TRIS-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| U | <i>unit</i> , Einheit |
| ü. N. | über Nacht |
| usw. | und so weiter |
| UV | ultraviolett |
| V | Volt |
| v/v | <i>volume per volume</i> , Volumenanteil pro Volumen |
| VVM | <i>volume air per volume medium and minute</i> |
| w/v | <i>weight per volume</i> , Gewichtsanteil pro Volumen |
| XCO ₂ | Anteil an Kohlenstoffdioxid an der Gesamtabluft |
| λ | Wellenlänge |

Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich bei meinen beiden Mentoren Prof. Dr. André Fleißner und Dr. Kathrin Bohle bedanken, dass sie mir die Möglichkeit gegeben haben, dieses interessante Projekt zu bearbeiten, indem sie die Kooperation vom Institut für Genetik und dem Fraunhofer ITEM vorangetrieben haben. Außerdem möchte ich mich für die hervorragende Betreuung, aber auch den großen Freiraum bedanken, den ich während meiner Doktorarbeit hatte.

Des Weiteren möchte ich Prof. Udo Rau für die freundliche Übernahme des Korreferats und Prof. Michael Hust für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission danken.

Besonderer Dank gilt Ulrike Brandt, die mich bei meinen gentechnischen Arbeiten durch Rat und Tat immer unterstützt hat und ohne die Vieles in dieser Zeit nicht hätte erreicht werden können. Gleichbedeutender Dank gilt Jörn Schottmann, der mich bei sämtlichen Kultivierungen am Fraunhofer ITEM unterstützt hat, ohne ihn wären die Reaktoren leer geblieben.

Für die Finanzierung dieses Projektes möchte ich Dr. Holger Ziehr vom Fraunhofer ITEM herzlichst danken.

Ich möchte allen Mitarbeitern, Doktoranden und Studenten an beiden Instituten für die stets freundliche Arbeitsatmosphäre sowie die zahlreichen fachlichen Diskussionen sowie weniger ernsten Gesprächen danken, die das Arbeiten immer sehr angenehm gemacht haben. In beiden Instituten wurde ich sofort aufgenommen und habe mich immer sehr wohl gefühlt. Außerdem möchte ich mich bei meinen Studenten Felicitas Vernen, Paula Werner, Felix Umrath, Karolina Leichtling und Johannes Gottschalk für die Mitarbeit an diesem Projekt bedanken. Zusätzlich möchte ich Stephanie Herzog für die Korrektur von Teilen dieser Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir mein Studium überhaupt erst ermöglicht haben und ohne deren Erziehung ich wahrscheinlich heute eine andere Arbeitseinstellung hätte.

Zuletzt geht mein Dank an meine Verlobte Deborah für all ihre Unterstützung im privaten wie auch im fachlichen Bereich. Durch die langen Stunden im Labor hat sie mich in den letzten Jahren weniger zu Gesicht bekommen, als es sie es verdient hätte.